

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.

# **Univerzita Karlova v Praze**

## **Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Bc. Martina Verdánová**

### **Interakce polyomavirů s proteazomálním systémem hostitelských buněk**

### **Interaction of polyomaviruses with proteasomal system of host cells**

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Alena Morávková, Ph.D.

Praha, 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 17. 08. 2011

Podpis

Zde bych ráda velmi poděkovala své školitelce **RNDr. Aleně Morávkové, Ph.D.** za nikdy nekončící ochotu během mého učení se práce v laboratoři a zvládnutí s tím souvisejících starostí stejně jako během vypracovávání mé diplomové práce. Děkuji jí za pomoc, rady a připomínky a také za její milý přístup.

Velmi děkuji vedoucí naší laboratoře **Doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc.** za dobré a lidské vedení naší pracovní skupiny a ochotu vždy pomoci.

Velký dík patří všem **členům laboratoře molekulární virologie** za velmi přátelskou atmosféru pracovní i mimopracovní. Děkuji **Mgr. Lence Horníkové** za zodpovídání všetečných laboratorních dotazů, **Mgr. Vojtovi Žilovi a Mgr. Martinu Fraiberkovi** za zhotovení elektronmikroskopických snímků, **Mgr. Borisi Ryabchenkovi** za pomoc při zvládnutí metody FISH, **RNDr. Radovanovi Fišerovi, Ph.D.** za pomoc při spektroskopických měřeních a **Mgr. Ondřeji Šebestovi** za snímky z konfokálního mikroskopu.

Děkuji také **Vlastě Sakařové a Ivaně Polívkové** za pomoc nejen s viry a tkáňovými kulturami a **Daně Beranové** za pomoc s administrativou.

Obrovský dík patří mým tolerantním rodičům a sestře za veškerou pomoc a rady nejen během celého mého studia. V neposlední řadě velmi děkuji svému příteli za duševní podporu a nekonečnou trpělivost.

Předkládaná diplomová práce vznikla v letech 2008 – 2011 za podpory grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy: Centrum ID-1M0508, Centrum LC545 a Výzkumný záměr MSM0021620858.

# Interakce polyomavirů s proteazomálním systémem hostitelských buněk

## **Abstrakt:**

Virová čeleď *Polyomaviridae* obsahuje mimo modelových virů - myšího polyomaviru a viru SV40 také lidské patogeny, mezi něž patří i virus BK. Polyomaviry jsou malé viry, jejichž kapsida není obalená a jako genom nesou dvouřetězcovou molekulu DNA. Porozumění jejich životnímu cyklu je nezbytné pro jejich využití v genové terapii nebo imunoterapii stejně jako pro prevenci či léčbu jimi způsobených komplikací. Tato diplomová práce je zaměřena na studium časně fáze infekce MPyV a viru SV40, tedy hlavně na dopravu virového genomu do jádra a roli proteazomálního systému hostitelských buněk v této fázi. Bylo zjištěno, že blokáce proteazómů specifickým inhibitorem vede ke zvýšení exprese časněho nestrukturního proteinu LT, který byl zvolen jako marker vstupu viru do jádra a úspěšné virové exprese. Sledování vzájemné lokalizace proteazómů a proteinu VP1 MPyV a viru SV40 ukázalo 10% kolokalizaci zmíněných struktur. Dále bylo zjištěno, že proteazomální inhibitor MG-132 zásadním způsobem negativně ovlivňuje replikaci DNA, a to jak virové tak buněčné. Dalším cílem této práce bylo připravit antigen – unikátní část proteinu VP2 BK viru – na výrobu protilátky. Nejprve byl vytvořen expresní vektor s vloženým DNA fragmentem unikátní části VP2 BKV, za který byla připojena kotva HisTag. Tento protein byl následně úspěšně produkován a izolován na principu afinitní chromatografie z bakterií BL-21. Byl tedy připraven antigen vhodný pro přípravu protilátky.

**Klíčová slova:** myší polyomavirus (MPyV), virus SV40, BKV, VP2, proteazóm, MG-132, epoxomicin, DNA, HisTag

## **Interaction of polyomaviruses with proteasomal system of host cells**

### **Abstract:**

Viral family *Polyomaviridae* includes besides model organisms - mouse polyomavirus and SV40 virus, also human pathogens, for example, BK virus. Polyomaviruses are small non-enveloped viruses with double-stranded DNA. Understanding of their life cycle is important for their use in gene therapy and immunotherapy as well as for prevention and treatment of complications caused by these viruses. This thesis is focused on early phases of MPyV and SV40 infection studying, mainly on delivery of viral genome to nucleus and role of proteasomal system in this stage of infection. It was found out that inhibition of proteasomes by specific inhibitor leads to increase of early non-structural protein LT expression, which was chosen as marker for viral entry to the nucleus and successful viral expression. Relative localization of proteasomes and VP1 protein of MPyV and SV40 was monitored and it showed 10% colocalization of mentioned structures. Further, it was found out that proteasomal inhibitor MG-132 negatively influences the replication of both viral and cellular DNA. Next aim of this diploma thesis was to prepare antigen – unique part of VP2 protein of BKV – for producing antibody. Expression vector with inserted fragment of unique part of VP2-BKV was firstly created, which was fused to HisTag. Then this protein was successfully produced and isolated from bacteria BL21 by affinitive chromatography. Antigen suitable for preparing antibody was prepared.

**Key words:** mouse polyomavirus (MPyV), SV40 virus, BKV, VP2, proteasome, MG-132, epoxomicin, DNA, HisTag

# OBSAH

1. ÚVOD A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	16
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	19
2.1 Polyomaviry .....	20
2.1.1 Struktura virionu polyomavirů .....	21
2.1.2 Organizace genomu polyomavirů .....	22
2.1.3 Infekční cyklus polyomavirů (MPyV, SV40 a BKV) .....	24
2.1.4 Vstup polyomavirů (MPyV a SV40) do buňky a jejich transport do ER ....	27
2.1.5 Transport polyomavirů (MPyV a SV40) z ER do jádra .....	28
2.2 Eukaryotický proteazomální systém .....	32
2.2.1 Struktura 26S proteazómu .....	33
2.2.2 Aktivátory 20S proteazómu .....	34
2.2.3 Ubiquitin a ubiquitylace .....	37
2.2.4 Ubiquitylace jako signál pro endocytózu .....	41
2.2.5 Degradace proteinů asociovaná s endoplazmatickým retikulem (ERAD) .....	43
2.3 Interakce virů s proteazomálním systémem .....	45
2.3.1 Zneužití hostitelského proteazomálního systému k úniku imunitnímu systému .....	45
2.3.2 Virové proteiny jako součást E3 ubiquitin ligáz .....	46
2.3.3 Virové proteiny, které inhibují E3 ubiquitin ligázy .....	47
2.3.4 Ubiquitylace nutná pro pučení virů z buňky .....	47
2.3.5 Proteazomální systém, ubiquitin a transport virů z plazmatické membrány do jádra .....	48
2.3.6 Vliv proteazomálního systému a ubiquitinu na virovou replikaci, transkripci a translaci .....	49
2.4 Proteazomální inhibitory .....	51
2.4.1 MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-al nebo také Cbz-LLL či z-LLL) .....	51
2.4.2 Epoxomicin ( $\alpha'$ , $\beta'$ - epoxyketon peptid) .....	51
3. MATERIÁL A METODY .....	53
3.1 Materiál .....	54
3.1.1 Přístroje .....	54
3.1.2 Chemikálie .....	55
3.1.3 Buněčné linie .....	57
3.1.4 Viry .....	57
3.1.5 Bakteriální kmeny .....	57
3.1.6 Plazmidy .....	57



3.1.7	Proteazomální inhibitory .....	57
3.1.8	Primery pro PCR reakce .....	58
3.1.9	Protilátky.....	58
3.1.10	Fluorescenční barviva a fluorogenní substráty .....	59
3.1.11	Enzymy.....	60
3.1.12	Složení nejčastěji používaných roztoků .....	60
3.1.13	Kultivační média .....	60
3.1.14	Antibiotika .....	61
3.1.15	Markery molekulových hmotností .....	61
3.1.16	Komerční soupravy .....	62
3.2	Metody .....	63
3.2.1	Práce s tkáňovými kulturami .....	63
3.2.1.1	Pasážování myších buněk 3T6, MEF a opičích Vero buněk .....	63
3.2.1.2	Počítání buněk v Bürkerově komůrce .....	63
3.2.1.3	Synchronizace savčích buněk .....	64
3.2.1.4	Standardní infekce buněk 3T6 a MEF MPyV a buněk Vero virem SV40 .....	64
3.2.1.5	Synchronizovaná infekce buněk 3T6 MPyV a buněk Vero virem SV40 .....	64
3.2.1.6	Fixace savčích buněk pro účely imunofluorescence .....	65
3.2.1.7	Nepřímé imunofluorescenční značení .....	65
3.2.2	Izolace myšího polyomaviru a viru SV40 .....	66
3.2.2.1	Centrifugace přes sacharózový polštář .....	67
3.2.2.2	Izopyknická centrifugace v rovnovážném CsCl gradientu .....	67
3.2.2.3	Dialýza .....	68
3.2.2.4	Hemaglutinační test .....	68
3.2.2.5	Určení infekčního titru viru pomocí imunofluorescence .....	69
3.2.2.6	Určení infekčního titru viru pomocí průtokové cytometrie .....	69
3.2.2.7	Určení infekčního titru viru pomocí plakové zkoušky .....	70
3.2.2.8	Elektronová mikroskopie .....	71
3.2.2.8.1	Negativní barvení .....	71
3.2.3	Průtoková cytometrie .....	71
3.2.3.1	Příprava a fixace buněk pro účely fluorescenční průtokové cytometrie .....	71
3.2.3.2	Fluorescenční značení vnitrobuněčných antigenů pro měření na průtokovém cytometru .....	72
3.2.3.3	Značení buněk propidium iodidem .....	72
3.2.4	Pokusy s proteazomálními inhibitory .....	73

3.2.5	Vyloučení proteolytické aktivity přítomné v používaném virovém inokulu pomocí fluorescenční spektroskopie .....	74
3.2.6	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) .....	75
3.2.6.1	Příprava DNA sondy na fluorescenční <i>in situ</i> hybridizaci .....	75
3.2.6.2	Vlastní fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace .....	75
3.2.7	Práce s bakteriemi .....	76
3.2.7.1	Kultivace bakterií .....	76
3.2.7.2	Příprava kompetentních buněk pro elektroporaci .....	77
3.2.7.3	Transformace bakteriálních buněk elektroporací .....	77
3.2.7.4	Skladování bakterií .....	78
3.2.7.5	Indukce bakterií k produkci požadovaného proteinu pomocí IPTG .....	78
3.2.8	Práce s DNA .....	79
3.2.8.1	Agarózová elektroforéza .....	79
3.2.8.2	Minipreparace plazmidové DNA alkalickou metodou .....	79
3.2.8.3	Minipreparace plazmidové DNA pomocí kitu QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) .....	80
3.2.8.4	Deproteinace DNA upraveným fenolem a chloroformem .....	81
3.2.8.5	Srážení DNA etanolem .....	81
3.2.8.6	Štěpení DNA restrikčními enzymy .....	81
3.2.8.7	Defosforylace vektorové DNA .....	82
3.2.8.8	Amplifikace DNA pomocí metody PCR .....	83
3.2.8.9	Izolace DNA z agarózového gelu kitem NucleoSpin® Extract II ....	83
3.2.8.10	Ligace DNA .....	84
3.2.8.11	Stanovení nukleotidové sekvence DNA .....	85
3.2.9	Práce s proteiny .....	85
3.2.9.1	Příprava bakteriálních vzorků pro SDS-PAGE .....	85
3.2.9.2	SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE) .....	86
3.2.9.3	Fixace a barvení gelu po SDS-PAGE .....	87
3.2.9.4	Western blot .....	87
3.2.9.5	Dot blot .....	88
3.2.9.6	Imunologická detekce proteinů imobilizovaných na membráně .....	88
3.2.9.7	Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové .....	89
3.2.9.8	Izolace proteinu s kotvou HisTag pomocí kolon HisTrap FF crude (GE Healthcare) .....	89
4.	VÝSLEDKY .....	91
4.1	Izolace polyomavirů .....	92

4.1.1	Izolace myšího polyomaviru .....	92
4.1.1.1	Optimalizace titrace MPyV pomocí průtokové cytometrie .....	96
4.1.2	Izolace viru SV40 .....	99
4.2	Vyloučení proteolytické aktivity přítomné v používaném virovém inokulu .....	103
4.3	Vliv proteazomální inhibice na produkci proteinu LT v různých fázích infekce MPyV .....	107
4.3.1	Vliv reverzibilního inhibitoru MG-132 .....	107
4.3.2	Vliv ireverzibilního inhibitoru epoxomicinu .....	113
4.4	Sledování vzájemné lokalizace proteazómů a proteinu VP1 MPyV a viru SV40 .....	115
4.5	Detekce virové DNA v přítomnosti inhibitoru proteazómů MG-132 .....	120
4.6	Vliv proteazomálního inhibitoru MG-132 na množství buněčné a virové DNA .....	131
4.7	Příprava antigenu, unikátní části proteinu VP2 BK VIRU, na přípravu protilátky .....	137
4.7.1	Konstrukce expresního vektoru s unikátní částí VP2 BKV .....	137
4.7.2	Produkce unikátní části VP2 BKV .....	147
4.7.3	Izolace unikátní části VP2 BKV .....	149
5.	Diskuze .....	152
5.1	Izolace polyomavirů - měření infekčního titru viru .....	153
5.2	Vyloučení proteolytické aktivity přítomné v používaném virovém inokulu .....	153
5.3	Vliv proteazomální inhibice na produkci proteinu LT v různých fázích infekce MPyV .....	154
5.4	Sledování vzájemné lokalizace proteazómů a proteinu VP1 MPyV a viru SV40 .....	156
5.5	Detekce buněčné a virové DNA v přítomnosti inhibitoru proteazómů MG-132 .....	156
5.6	Příprava antigenu, unikátní části proteinu VP2 BK viru, na přípravu protilátky .....	159
6.	Souhrn .....	162
7.	Seznam použité literatury .....	164

## Seznam použitých zkratk

19 S RP	regulační proteazomální podjednotka 19S (=PA700) (regulatory particle)
20S CP	20S proteazóm, katalytická podjednotka proteazómu (core particle)
26S	proteazóm mající jednu CP a jednu RP podjednotku, ale také proteazóm s jednou CP a dvěma RP
2n	diploidní
AAV	adeno-asociovaný virus
AF	Alexa fluor
APS	amonium persulfát
ATP	adenosintrifosfát
BKV	virus BK
BSA	bovinní sérový albumin
CBBG250	Coomassie brilliant blue G250
CR	společná oblast (common region)
DAPI	4,6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	demineralizovaná destilovaná voda
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DMEM	Dublecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTPs	deoxyribonukleosid trifosfáty
DTT	dithiothreitol
DUB	deubiquitylační enzym (deubiquitinating enzyme)
E1	ubiquitin aktivující enzym
E2	ubiquitin konjugační (přenášející) enzym
E3	ubiquitin ligáza
E4	enzymy prodlužující ubiquitinový řetězec
E6	časný papillomavirový onkoprotein
E6-AP	E6 asociovaný protein

EBNA1	protein viru Epstein-Barrové (Epstein-Barr virus encoded nuclear antigen 1)
EDEM	ER degradation enhancing $\alpha$ -mannosidase-like protein
EDTA	ethylendiamintetraacetát disodný
ER	endoplazmatické retikulum
ERAD	degradační dráha asociovaná s endoplazmatickým retikulem (ER associated protein degradation)
EtOH	ethanol
FBS	fetální bovinní sérum
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GA	Golgiho aparát
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
HAU	hemaglutinační jednotky (haemagglutination units)
HECT	doména E3 enzymů homologická s C-koncem proteinu E6-AP (homology to E6-associated protein C-terminus)
HIV-1	lidský virus imunodeficiency 1 (human immunodeficiency virus 1)
hod	hodina
hpi	hodin po infekci (hours post infection)
HPV 16	lidský papillomavirus 16 (human papillomavirus 16)
HPV 18	lidský papillomavirus 18 (human papillomavirus 18)
HRP	křenová peroxidasa (horseradish peroxidase)
HSV	herpes simplex virus
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
JCV	virus JC
KIV	virus KI
LT	velký T antigen (large T antigen)
LTR	long terminal repeat
MCPyV	Merkel cell polyomavirus
MetOH	methanol
MG-132	reverzibilní proteazomální inhibitor

MHC	hlavní histokompatibilní komplex (main histocompatibility complex)
min	minuta
MOI	multiplicita infekce (multiplicity of infection)
MPyV	myší polyomavirus (mouse polyomavirus)
MRN	komplex proteinů MRE11, RAD50 a NBS1
mRNA	messenger RNA
MT	střední T antigen (middle T antigen)
MVB	multivezikulární tělíska (multivesicular body)
MVM	Minute virus of mice
OD	optická denzita
ODC	ornitin dekarboxyláza
PA200	aktivátor 20S proteazómu (=Bln10)
PA28	aktivátor 20S proteazómu (=11S či REG)
PBS	pufr fosfátových solí (phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PDI	protein disulfid izomeráza
PFA	paraformaldehyd
pfu	plaque forming units
PHD	motiv plant homeodomain
PI	propidium iodid
PML	progresivní multifokální leukoencefalopatie
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
RING	doména E3 enzymů (really interesting new gene)
rpm	otáčky za minutu (rotations per minute)
Rpn	podjednotky 19S RP nevykazující ATPázovou aktivitu (regulatory particle non-ATPase)
Rpt	podjednotky 19S RP vykazující ATPázovou aktivitu (regulatory particle triple-A protein)

s	sekunda
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
siRNA	malá interferující RNA (small interfering RNA)
SSC	saline-sodium citrate
ST	malý T antigen (small T antigen)
SV40	simian vacuolating virus 40
TBTB	thiazolyl blue tetrazolium bromide
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSV	trichodysplasia spinulosa-associated virus
U	jednotky (units)
UBD	ubiquitin vazebná doména (ubiquitin binding domain)
UPR	unfolded protein response
VCP	valozin obsahující protein (=ATPáza p97, Cdc48p, valosin containing protein)
VLP	viru podobné částice (virus like particles)
VP1	hlavní strukturní protein polyomavirů
VP2	minoritní strukturní protein polyomavirů
VP3	minoritní strukturní protein polyomavirů
WUV	virus WU

# **1. Úvod a cíle diplomové práce**



Mezi modelové viry čeledi *Polyomaviridae* patří myší polyomavirus a virus SV40. Díky studiu těchto virů byla objevena a pochopena řada molekulárních procesů v buňce, například replikace buněčné DNA či úpravy RNA. Polyomaviry byly nejdříve studovány z důvodu jejich onkogenního potenciálu a nyní především díky jejich možnému využití v genové terapii či imunoterapii. Tato oblast využití je spojována s polyomaviry především díky schopnosti hlavního kapsidového proteinu VP1 se samouspořádat do viru podobných částic (VLP). Abychom mohli plně využít potenciál VLP, je nezbytné detailně porozumět životnímu cyklu viru, cestám viru skrz buňku, stavům a procesům, které virus v buňce navozuje a jak buňka na virovou infekci reaguje. Interakce virů s buňkou je složitý soubor dějů, nikdy nekončící boj o rychlejší a efektivnější obranu proti soupeři. Buňka se snaží různými mechanismy zabránit úspěšnému pomnožení viru a virus naopak využívá řadu mechanismů, jak buněčným obranným systémům uniknout a dokonce jak je využít ve svůj prospěch. Toto se týká i proteazomálního systému buňky, jehož hlavním úkolem je degradovat chybně sbalené, poškozené a nepotřebné proteiny. Dlouhodobě se v naší laboratoři zabýváme problematikou časně fáze polyomavirové infekce, tedy především dopravou viru od plazmatické membrány do jádra hostitelské buňky a uvolnění virového genomu. Zajímalo nás, jakou roli v této fázi životního cyklu MPyV a viru SV40 hrají proteazómy.

Jsou známy i primátí zástupci polyomavirů, mezi něž patří virus BK, jehož studiem se v naší laboratoři mimo jiné v posledních letech zabýváme. Zde také hraje významnou roli dobré pochopení životního cyklu viru a jeho interakcí s hostitelskou buňkou především z medicínského hlediska při vývoji preventivních a léčebných prostředků proti virům. Jedním z důležitých nástrojů pro výzkum virů jsou protilátky namířené proti virovým strukturám. V naší laboratoři je virus BK nejnověji studovaným virem a zatím tedy nevlastníme všechny potřebné protilátky proti BK virovým strukturám a proto je část této diplomové práce věnována přípravě antigenu na výrobu protilátky proti unikátní části minoritního strukturního proteinu VP2 BK viru.

**Cíle této diplomové práce jsou:**

- 1. Prozkoumat roli proteazómů v časných fázích životního cyklu myšího polyomaviru a přispět k objasnění úlohy proteazómů v životním cyklu viru SV40.**

**Dílčí cíle:**

- ✓ vyizolovat MPyV a virus SV40 bez proteolytických aktivit v inokulu
- ✓ sledovat vliv inhibice proteazómů pomocí reverzibilního inhibitoru proteazómů MG-132 a ireverzibilního inhibitoru epoxomicinu na různé časně fáze infekce MPyV pomocí detekce proteinu LT
- ✓ sledovat vzájemnou lokalizaci proteinu VP1 MPyV a viru SV40 s proteazómy
- ✓ sledovat vliv inhibice proteazómů s použitím reverzibilního inhibitoru proteazómů MG-132 na dopravu MPyV genomu do jádra pomocí detekce virové DNA

- 2. Připravit antigen – unikátní část proteinu VP2 BK viru – pro přípravu protilátky.**

**Dílčí cíle:**

- ✓ zkonstruovat expresní vektor s vloženým genem pro unikátní část proteinu VP2 BKV
- ✓ produkovat unikátní část proteinu VP2 BKV v bakteriích BL21
- ✓ izolovat unikátní část proteinu VP2 BKV z bakterií BL21 pomocí kotvy HisTag

## **2. Literární přehled**

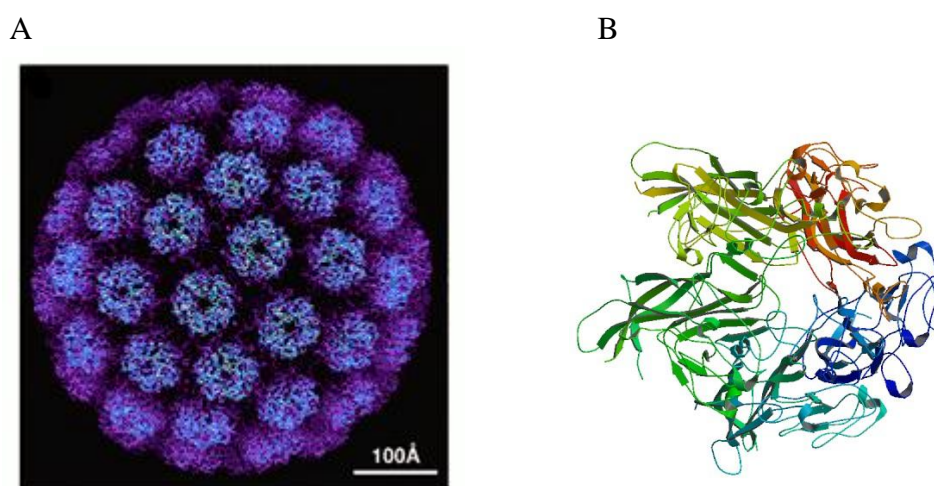
## 2.1 POLYOMAVIRY

Polyomaviry (čeleď *Polyomaviridae*) jsou malé neobalené tumorogenní viry, jejichž genomem je dvouřetězcová DNA. Hostitelské spektrum těchto virů je velmi široké, zahrnuje ptáky i savce včetně člověka. Mezi zástupce čeledi *Polyomaviridae* napadající člověka patří virus JC (JCV) (Padgett *et al.* 1971), virus BK (BKV) (Gardner *et al.* 1971) a dále nově popsané viry KI (KIV) (Allander *et al.* 2007), WU (WUV) (Gaynor *et al.* 2007) a Merkel cell polyomavirus (MCPyV), jehož sekvence byly objeveny v karcinomech Merkelových buněk (Feng *et al.* 2008). Všechny lidské polyomaviry jsou v populaci hojně rozšířené. Virus JC a virus BK bývají latentně přítomny v organismu, často bez klinických projevů. Při imunodeficienci však dochází k jejich aktivaci. Onemocnění, které způsobuje JCV se nazývá progresivní multifokální leukoencefalopatie (PML), kdy je postižena bílá hmota mozku. Infekce BKV se projeví u imunosuprimovaných jedinců nejčastěji jako nefropatie. Klinická data ukazují, že infekce virem BK je jedna ze závažných příčin odhojení štěpu při transplantaci ledvin. Viry KI a WU byly identifikovány ve výměšcích žláz dýchacích cest z pacientů s infekcí dýchacího ústrojí. Prozatím ale nebylo dokázáno, že tyto dva viry způsobují nějaké onemocnění. MCPyV bývá asociován s většinou případů nádoru Merkelových buněk (Merkel cell carcinoma). Tento karcinom je relativně vzácné onemocnění kůže, ale bývá velmi agresivní a prognózy jsou většinou špatné. V loňském roce (2010) byl objeven další lidský polyomavirus s názvem trichodysplasia spinulosa-associated virus (TSV) (van der Meijden *et al.* 2010). TSV byl identifikován u lidí po transplantaci srdce, většina z nich trpěla vzácným onemocněním kůže trichodysplasia spinulosa, které se vyskytuje výhradně u lidí s oslabenou imunitou.

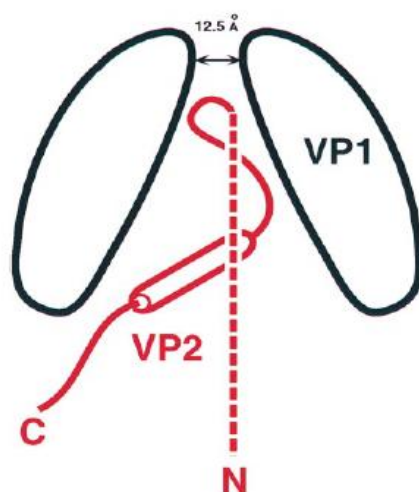
Mezi modelové a tím nejvíce prostudované zástupce čeledi *Polyomaviridae* patří virus SV40 (simian vacuolating virus 40) a myší polyomavirus (MPyV). Hostitelem viru SV40 je opice. SV40 byl objeven jako kontaminant poliovirové vakcíny (Eddy *et al.* 1962). Jeho sekvence však byly detekovány i v lidských buňkách. Není zcela jasné, zda je pro lidský organismus patogenní, i když většina autorů tuto možnost odmítá. Další modelový zástupce čeledi *Polyomaviridae* je virus, který napadá myši – MPyV. Je to první polyomavirus, který byl izolován (Gross 1953) a to díky jeho schopnosti navodit vznik nádorů u myší.

### 2.1.1 Struktura virionu polyomavirů

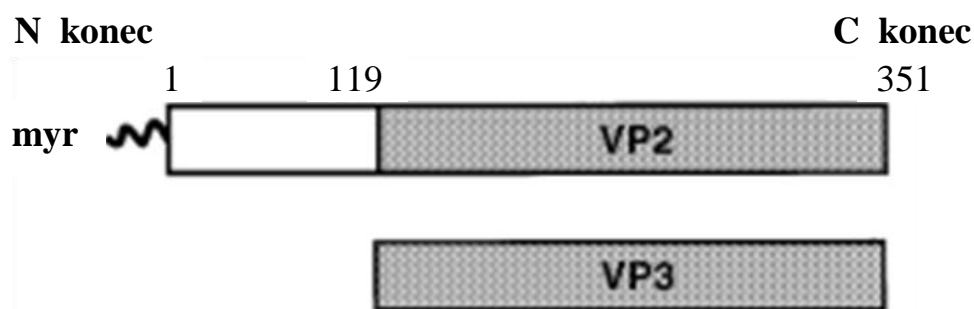
Kapsida polyomavirů vykazuje ikosahedrální symetrii a má v průměru 45 nm. Skládá se ze 72 pentamer hlavního strukturního proteinu VP1 (Liddington *et al.* 1991) (Obr. 2.1). Každý pentamer VP1 váže pomocí hydrofobních interakcí jeden z minoritních strukturních proteinů polyomavirů – VP2 nebo VP3 (Obr. 2.2). Proteiny VP2 a VP3 mají stejnou sekvenci na svém C konci a liší se svým N koncem, který má protein VP2 delší o tzv. unikátní část (Obr. 2.3). Protein VP2 je na svém N konci myristylován (Streuli and Griffin 1987, Chen *et al.* 1998). Kapsida tvořená třemi kapsidovými proteiny VP1, VP2 a VP3 obklopuje virový minichromozom, což je virová DNA spolu s hostitelskými histony H2A, H2B, H3 a H4.



Obr. 2.1: **Model kapsidy polyomavirů (konkrétně SV40).** A – Polyomavirová kapsida tvořena 60 hexavalentními a 12 pentavalentními pentamerami proteinu VP1. Upraveno podle Harrison 2007. B – Struktura jednoho pentameru proteinu VP1, každá molekula proteinu VP1 je označena jinou barvou. Převzato z <http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=3BWQ>.



Obr. 2.2 : **Schématické znázornění interakce proteinu VP1 s proteiny VP2/VP3.** Uvnitř každého pentameru hlavního strukturního proteinu VP1 se nachází jeden z minoritních strukturních proteinů, buď VP2 nebo VP3. Převzato z Chen *et al.* 1998.

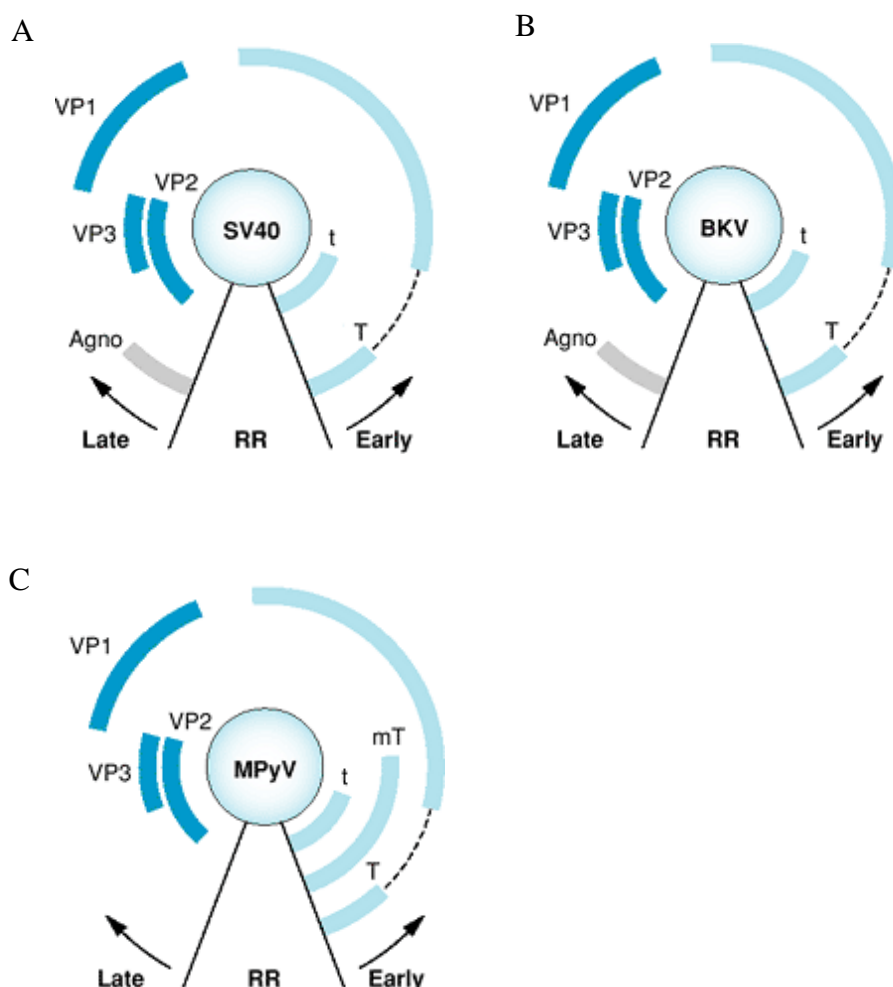


Obr. 2.3: **Schématické znázornění strukturních minoritních proteinů VP2 a VP3 BK viru.** C konec mají oba proteiny VP2 a VP3 stejný. Protein VP2 je delší o svou unikátní část, na jejímž N konci je myristylován. Protein VP3 je tedy zkrácenou formou proteinu VP2. Obecné schéma je shodné pro všechny polyomaviry, vyznačené délky unikátní části proteinu VP2 a celého proteinu VP3 jsou specifické pro BK virus. Upraveno podle Chen *et al.* 1998.

### 2.1.2 Organizace genomu polyomavirů

Genom polyomavirů je velký přibližně 5 kbp, je tvořen kruhovou dvouřetězcovou DNA a můžeme ho rozdělit na tři oblasti: časnou, pozdní a regulační oblast.

Časná oblast kóduje geny pro časné nestrukturní proteiny – T antigeny (velký, střední a malý T antigen - LT, MT a ST u MPyV, u primátích polyomavirů byly popsány pouze dva T antigeny – velký a malý). K transkripci časné oblasti genomu dochází hned po jeho doručení do jádra hostitelské buňky. Vzniká jeden primární transkript, který alternativním sestřihem dává vznik třem různým mRNA (pro LT, MT a ST). U MPyV dochází k syntéze proteinu LT 6 – 8 hpi a proteiny MT a ST jsou syntetizovány 16 – 18 hpi (Chen a Fluck 2001). Pozdní oblast genomu kóduje geny pro pozdní strukturní proteiny – VP1, VP2 a VP3 u MPyV i primátích polyomavirů a agno protein pouze u primátích polyomavirů. Tyto proteiny jsou výrazně exprimovány až po zahájení replikace DNA. Mezi časnou a pozdní oblastí genomu se vyskytuje regulační oblast. Tato oblast obsahuje jediný počátek replikace (ori), promotory a enhancery pro časnou i pozdní transkripci. Časná oblast genomu je transkribována z jednoho řetězce DNA a pozdní z druhého komplementárního vlákna DNA (shrnutí na Obr. 2.4).



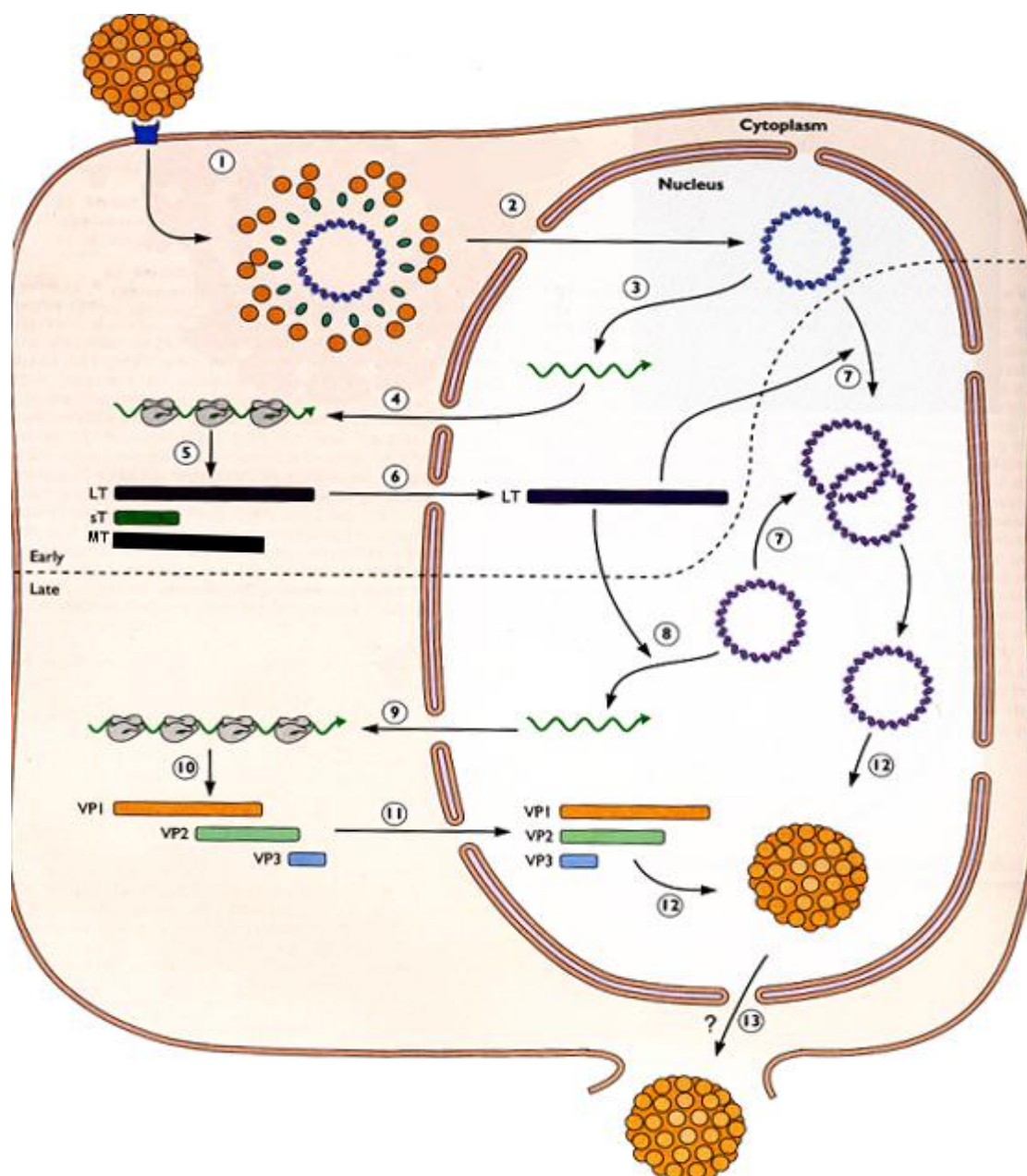
Obr. 2.4: Schématické znázornění genomu SV40 (A), BKV (B) a MPyV (C). Časně (early) se exprimující proteiny jsou tzv. T antigeny – velký (T), střední (mT) a malý (t), přičemž virus SV40 a virus BK kódují pouze velký a střední T antigen. Pozdně (late) se exprimující proteiny jsou hlavní strukturní kapsidový protein VP1 a minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3. Virus SV40 a virus BK mají navíc agno protein. Upraveno podle Imperiale a Major 2007.

### 2.1.3 Infekční cyklus polyomavirů (MPyV, SV40 a BKV)

Infekční cyklus MPyV trvá 48 hodin a viru SV40 72 hodin. U viru BK není přesný časový údaj zatím znám. Infekční cyklus polyomavirů začíná přichycením viru na buněčný receptor. Následně je virus internalizován buňkou, přičemž cílem viru je dopravit svůj genom do buněčného jádra. V průběhu cesty viru od buněčné membrány k jádru je virová kapsida rozvolněna (více k časně fázi infekce viz kapitoly 2.1.4 a 2.1.5). Po doručení virové DNA do jádra dochází k expresi časných T antigenů.



Velký T antigen je nezbytný pro zahájení replikace virové DNA pomocí interakce s hostitelskými replikačními faktory. V průběhu replikace virového genomu a v pozdějších stádiích dochází k expresi pozdních virových strukturních proteinů VP1, VP2 a VP3. Ve chvíli, kdy je nasyntetizováno dostatečné množství strukturních proteinů, dochází k morfogenezi virionů, jejímž výsledkem je virová kapsida, uvnitř které se nachází virová DNA. Nově vzniklé viriony jsou uvolněny do okolí po lyzi buňky (shrnutí na Obr. 2.5). Výše popsany sled dějů je typický pro produktivní infekci a děje se tak u buněk permissivních pro virus. V buňkách nepermissivních pro virus dochází k abortivní infekci. V tomto případě nedochází k replikaci virové DNA, ale k prodloužené expresi časných antigenů, což může mít za následek až transformaci napadené buňky.



**Obr. 2.5: Schématické znázornění infekčního cyklu MPyV.** Infekční cyklus polyomavirů můžeme rozdělit na 2 fáze: časnou (early, kroky 1 - 6) a pozdní (late, kroky 7 - 13). Časná fáze infekce MPyV začíná přichycením viru na specifický buněčný receptor a končí expresí časných T antigenů. Pozdní fáze infekce MPyV začíná replikací virové DNA a končí uvolněním nově vytvořeného virionu po lyzi infikované buňky. Především kroky 1 a 2 nejsou zatím plně objasněny. LT – velký T antigen, MT – střední T antigen, ST – malý T antigen. Upraveno podle Flint 2004.

### 2.1.4 Vstup polyomavirů (MPyV a SV40) do buňky a jejich transport do ER

Polyomavirus se dostává do buňky receptorem zprostředkovanou endocytózou. MPyV se váže na specifické receptory, gangliosidy GD1a a GT1b. Virus SV40 využívá pro přichycení se na buněčný povrch gangliosid GM1. Všechny tři zmíněné glykosylované gangliosidy obsahují kyselinu sialovou, na kterou se přímo váže virový protein VP1. Gangliosidy jsou glykolipidy složené z ceramidu, glukózy, galaktózy, N-acetylgalaktozaminu a nezbytné kyseliny sialové. Za vazbu na specifické receptory buněk zodpovídá hlavní strukturní protein polyomavirů VP1, který se nachází na povrchu virionu. Během své cesty do jádra hostitelské buňky se virová kapsida v několika krocích v různých částech buňky postupně rozvolňuje. K první konformační změně proteinu VP1 dochází hned po jeho vazbě na kyselinu sialovou na povrchu buňky (Cavaldesi *et al.* 2004). Podle některých výsledků MPyV může využívat pro vstup do hostitelské buňky také koreceptor  $\alpha 4\beta 1$  integrin (Caruso *et al.* 2003). Po receptorem zprostředkované endocytóze jsou polyomaviry cíleny do endoplazmatického retikula. Zdá se, že MPyV využívá více endocytických drah. MPyV je buňkou internalizován v monopinocytických váčcích (Griffith a Consigli 1984). Virus využívá ke vstupu do buněk membránových mikrodomén, včetně těch ze kterých jsou odvozeny kaveoly (Richterová *et al.* 2001). Monopinocytické váčky obsahující MPyV posléze fúzí s časnými endozómy. Bylo prokázáno, že infektivita MPyV je senzitivní ke zvyšujícímu se endozomálnímu pH (Liebl *et al.* 2006). Nově bylo popsáno, že pro infekci je také důležitý transport MPyV do pozdních endolyzozómů, který předchází transportu do ER (Qian *et al.* 2009). Autoři ukazují, že transport viru z endolyzozómů do ER je řízený receptorem pro MPyV, gangliosidem GD1a. Zdá se tedy, že MPyV potřebuje pro úspěšné dopravení své DNA do jádra projít prostředím se sníženým pH, které umožní další rozvolnění virové kapsidy.

Virus SV40 může vstupovat do buněk prostřednictvím kaveol. Dřívější publikace ukazovaly, že virus postupuje z kaveol do větších endozómů bohatých na kaveolín – kaveozómů (Pelkmans *et al.* 2001). Ale v roce 2011 členové téže laboratoře, kteří zavedli pojmenování pro nový buněčný kompartment - kaveozómy, tuto hypotézu vyvrátili (Engel *et al.* 2011). V dřívějších pokusech, ze kterých byl vyvozen model kaveozómů, bylo pracováno s buňkami se zvýšenou expresí kaveolínu. Autoři nyní hovoří o bývalých kaveozómech jako o modifikovaných pozdních endozómech či endolyzozómech, ve kterých se kumuluje kaveolín-1 díky jeho zvýšené expresi. Tento nadbytečný kaveolín je ubiquitinylován a endocytován a před svou lyzozomální degradací se hromadí v pozdních endozómech.

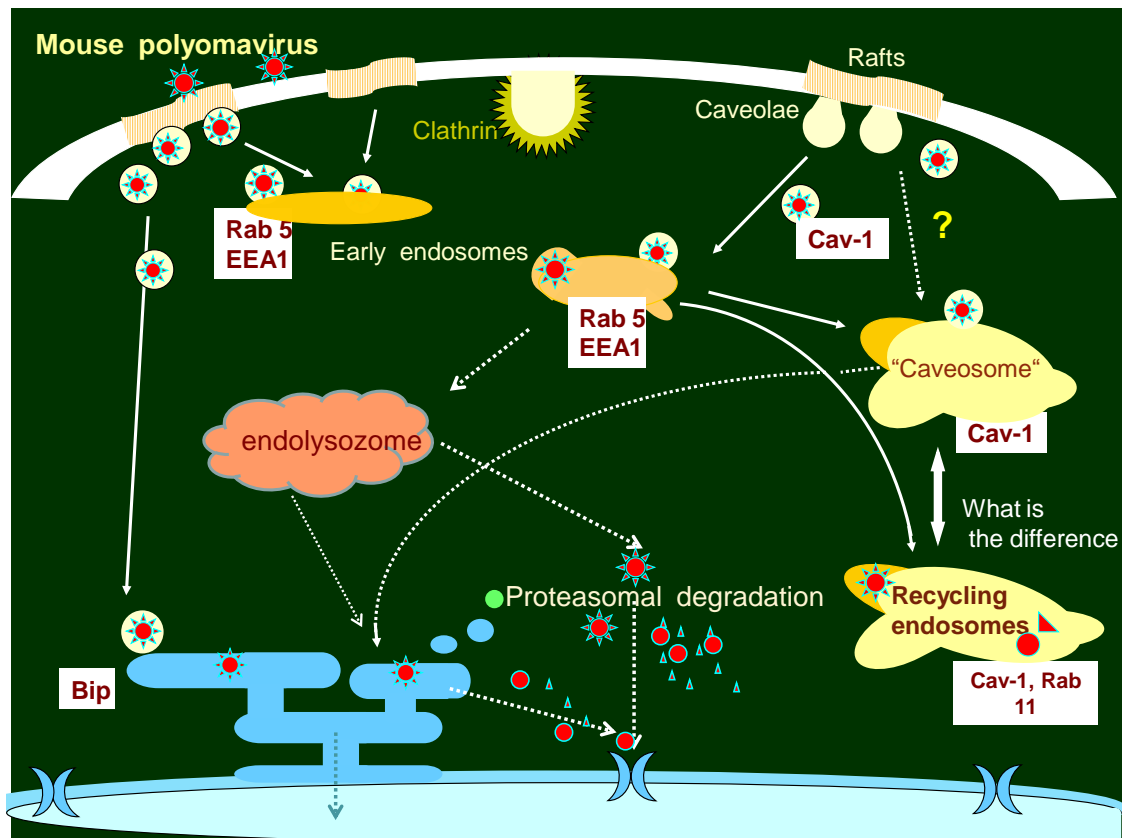
Podle nejnovějších zdrojů (Engel *et al.* 2011) využívá virus SV40 kromě endocytózy pomocí kaveolínu i cestu nezávislou na kaveolínu, ale závislou na lipidových raftech. Následně se virus dostává do časných endozómů a posléze i do pozdních endozómů, eventuálně endolysosómů a odtud do ER. Dřívější publikace (Ashok *et al.* 2003) ukazovaly, že virus SV40 je na endozomálním pH nezávislý. Nejnovější doklady svědčí o opaku, pokud bylo zvýšeno vakuolární pH, snížil se počet buněk exprimujících T antigen o 85% (Engel *et al.* 2011). Co se týče zapojení Golgiho aparátu do cesty polyomavirů od cytoplazmatické membrány do ER, zdá se, že MPyV tímto kompartmentem neprochází. Mannová a Forstová 2003 ukázaly, že infektivita MPyV není inhibována brefeldinem A, který blokuje retrográdní transport závislý na COP I z GA do ER. Gilbert a Benjamin 2004 naopak ukázali, že brefeldin A blokuje transport MPyV k ER a virus se pak shromažďuje v prostředí bohatém na kaveolín-1. V případě viru SV40 se ukázalo, že brefeldin A má negativní vliv na infektivitu SV40. Také byla nalezena vysoká kolokalizace proteinu VP1 s proteinem  $\beta$ -COP, který je součástí COP1 váčků (Norkin *et al.* 2002). Přímo v GA nebyly ale nikdy viriony SV40 nalezeny.

### **2.1.5 Transport polyomavirů (MPyV a SV40) z ER do jádra**

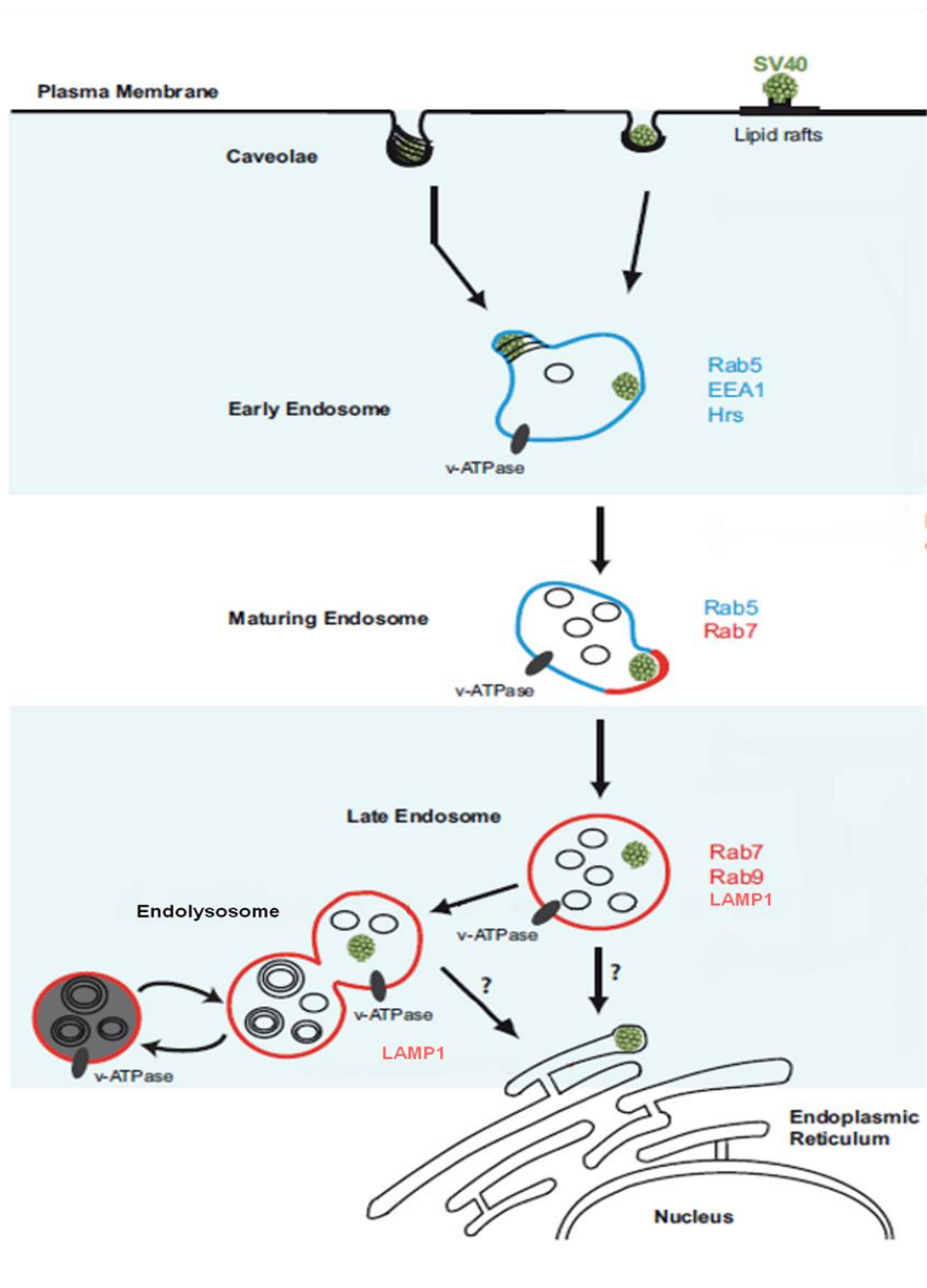
Nevyřešenou otázkou zůstává, jakým způsobem je virový genom dopraven do jádra hostitelské buňky. Předpokládány jsou v zásadě dvě různé možnosti – virus proniká do jádra přímo z ER nebo je z ER translokován do cytoplazmy a odtud proniká jadernými póry do jádra (Daniels *et al.* 2006). Zcela vyloučena však ani není možnost narušení jaderné membrány virovými proteiny a vstup do jádra nezávislý na jaderných pórech (Liebl, nepublikovaná data). V ER se pravděpodobně nacházejí komponenty, které indukují další strukturní změny virionu a tím napomáhají k uvolnění viru z ER. Člen proteinové rodiny protein disulfid izomeráz (PDI) ERp29 je schopen změnit konformaci C koncového ramene VP1 MPyV, čímž se pravděpodobně odhalí minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3. Tyto proteiny obsahují hydrofobní úseky, které mají afinitu k membránám a mohou se začlenit do membrány ER, přičemž schopnost perforovat membránu ER má pouze protein VP2 (Magnuson *et al.* 2005, Rainey-Barger *et al.* 2007). Potlačení exprese protein disulfid izomerázy (PDI), hlavního proteinu ER umožňujícího oxido-redukční reakce, snižuje infektivitu MPyV (Gilbert *et al.* 2006) i viru SV40 (Schelhaas *et al.* 2007). Schelhaas *et al.* 2007 dále ukázali, že infektivitu SV40 snižuje také potlačení exprese PDI-like proteinu ERp57, což je thiol-disulfid oxidoreduktáza, která napomáhá destabilizaci virové kapsidy složené z VP1. Snížení exprese proteinu ERp29 a chaperonů calnexinu a calreticulinu infektivitu SV40 neovlivnila.

Ukazuje se, že MPyV (Lilley *et al.* 2006) i virus SV40 (Schelhaas *et al.* 2007) by mohly využívat pro svou dopravu do cytoplazmy komponenty ERAD dráhy. ERAD dráha (ER associated protein degradation) je systém, který rozpozná a transportuje špatně sbalené proteiny z ER do cytoplazmy, kde je následně daný protein degradován pomocí proteazómů. Jedním z proteinů účastnících se této dráhy ERAD je transmembránový protein ER Derlin-2, který je zodpovědný za transport nesprávně sbalených proteinů z ER do cytoplazmy. Pokud je snížena exprese Derlinu-2, dojde ke snížení MPyV infekce o 50 - 75%. U viru SV40 byl pozorován podobný jev, infekce SV40 byla senzitivní ke snížené expresi proteinů Derlin-1 a Sel1L, což jsou komponenty ERAD dráhy.

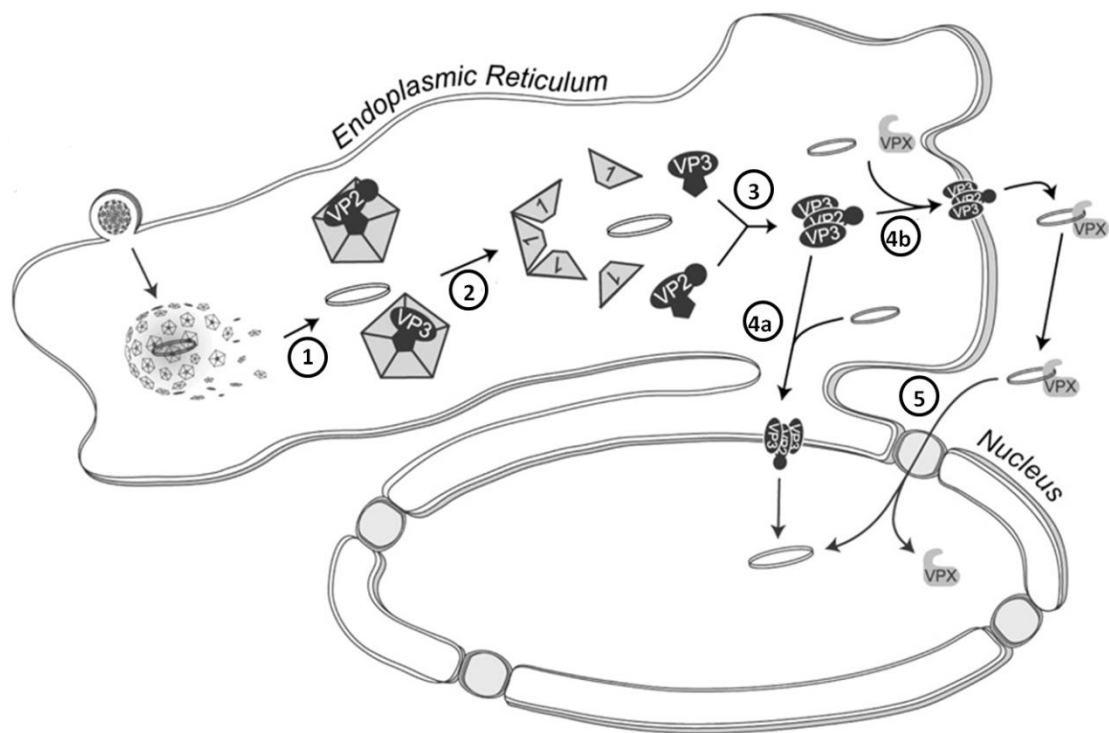
Virus se musí nějakým způsobem dostat z ER do jádra a na tomto místě se uvažují v zásadě dva způsoby, jak toho virus může dosáhnout. Jednou možností je využití ERAD dráhy, čímž by se virus dostal z ER do cytoplazmy a odtud jadernými póry do jádra. Druhou možností je využití schopnosti proteinů VP2 a VP3 narušovat membrány, což by mohl být také způsob, jak dopravit genom viru z ER přímo do jádra buňky. Daniels *et al.* 2006 ukázali u viru SV40 schopnost VP2 a VP3 permeabilizovat buněčné membrány. Shrnutí dosud známých či uvažovaných drah dopravy MPyV z cytoplazmatické membrány do jádra je zobrazeno na Obr. 2.6. Aktualizované schéma dopravy viru SV40 do ER je vyobrazeno na Obr. 2.7 a následná doprava SV40 z ER do jádra je navržena na Obr. 2.8. Způsob jakým je skutečně dopravována virová DNA do jádra však zatím zůstává zcela neznámý.



Obr. 2.6: Shrnutí dosud známých nebo navrhovaných drah dopravy MPyV z cytoplazmatické membrány do jádra. Je pravděpodobné, že MPyV využívá více endocytických drah. Během své dopravy do jádra však potřebuje projít kompartmentem s nízkým pH, které umožní rozvolnění kapsidy. Po receptorem zprostředkované endocytóze je MPyV cílen do ER, odkud putuje do jádra buď přímo z ER, nebo nejdříve do cytoplazmy a poté jaderným pórem do jádra. Upraveno podle Forstová, nepublikovaná data.



Obr. 2.7: Shrnutí nejnovějších poznatků ohledně vstupu SV40 do buňky a jeho **dopravy do ER**. SV40 vstupuje do buněk prostřednictvím receptoru GM1 cestou závislou buď na kaveolách nebo na lipidových raftech. Následně virus projde časnými endozómy a poté je směřován do pozdních endozómů, eventuálně endolyzozómů. Z těchto kompartmentů je virus cílen do ER. Kyselé prostředí je důležité pro transport SV40 do ER, v-ATPase = vakuolární ATPáza. Po pravé straně jsou vedle konkrétních kompartmentů zaznamenány modře a červeně jejich markery. Upraveno podle Engel *et al.* 2011.



Obr. 2.8: **Navrhovaný model dopravy SV40 z ER do jádra.** 1 – Když se virus SV40 dostane do ER, dojde zde k rozvolnění kapsidy za pomoci chaperonů ER a k asociaci VP1 pentamer s proteiny VP2 a VP3. 2 – Další disociace VP1 pentamer vede k uvolnění VP2 a VP3. 3 – Proteiny VP2 a VP3 oligomerizují. 4a – Shloučené minoritní proteiny VP2 a VP3 můžou vytvořit pór ve vnitřní jaderné membráně a umožnit tak průchod virového genomu přímo do jádra. 4b – Minoritní proteiny mohou vytvořit pór také v membráně ER a napomoci translokaci virového genomu do cytoplazmy. 5 – Virový genom spolu s jedním ze strukturních proteinů (VPX), který nese jaderný lokalizační signál a doménu pro vazbu DNA, může být dopraven z cytoplazmy do jádra jaderným pórem. Upraveno podle Daniels *et al.* 2006.

## 2.2 EUKARYOTICKÝ PROTEAZOMÁLNÍ SYSTÉM

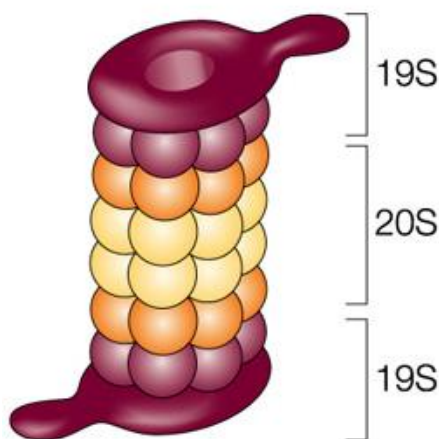
Proteazomální systém je hlavní dráhou pro degradaci intracelulárních proteinů. Podílí se na odstraňování chybně sbalených, poškozených a nadbytečných proteinů z cytoplazmy, endoplazmatického retikula a jádra. Hraje roli v mnoha základních buněčných procesech jako je např. regulace buněčného cyklu, zpracování antigenů za účelem prezentace na povrchu buňky pomocí MHC I molekul, kontrola kvality nově nasyntetizovaných proteinů (ERAD), regulace genové exprese, opravy DNA nebo regulace buněčné diferenciace. Proteazómy obecně nalezneme v cytoplazmě i jádře, avšak existuje více typů proteazómů s různými specifikami.



Proteazómy štěpí specifické substráty. Degradace proteinů proteazómy může být závislá i nezávislá na ATP a stejně tak je v některých případech vyžadována ubiquitinová značka na proteinu určenému k degradaci (min. 4 molekuly ubiquitinu) a jindy tato značka nutná není. Proteazóm disponuje třemi druhy proteolytické aktivity - chymotrypsinovou, trypsinovou a peptidyl-glutamyl peptidázovou (též caspase-like) aktivitou.

### 2.2.1 Struktura 26S proteazómu

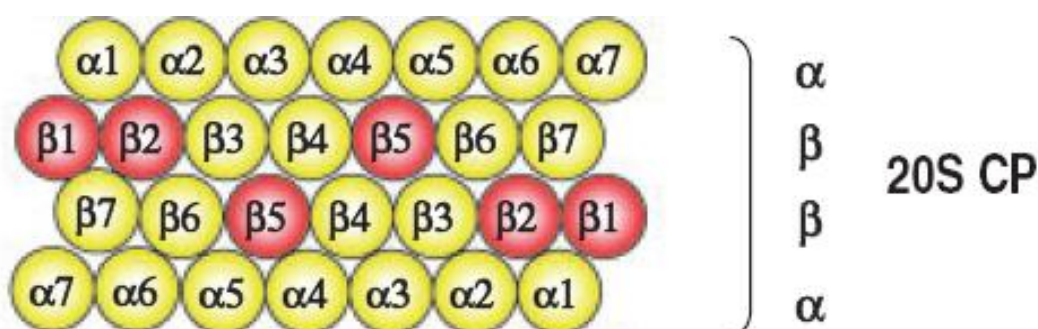
26 S proteazóm je multiproteinový komplex, který se skládá ze dvou částí: jedné katalytické podjednotky (core particle, CP) nazývané též 20S proteazóm a jedné nebo dvou regulačních podjednotek (regulatory particles, RP) známé také jako 19S podjednotky či PA700 podjednotky. Tyto regulační podjednotky jsou umístěny na konci či obou koncích katalytické podjednotky (Obr. 2.9). 20S proteazóm se může vyskytovat v buňce i samostatně, ale právě přítomnost regulačních podjednotek neboli aktivátorů umožňuje zvýšení efektivity proteazómu. Pokud se píše o 26S proteazómu, má se na mysli proteazóm obsahující jednu CP a jednu RP, ale také proteazóm s jednou CP a dvěma RP (takový komplex má pak skutečný sedimentační koeficient 30S) (Tanaka 2009, Xie 2010).



Obr. 2.9: **Schématicky znázorněná struktura 26S proteazómu.** 26S proteazóm se skládá z jedné katalytické podjednotky 20S a dále z jedné nebo dvou regulačních podjednotek 19S. Upraveno podle [http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n5/fig\\_tab/nrc1361\\_F2.html](http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n5/fig_tab/nrc1361_F2.html).

Standardní 20S proteazóm (CP) má hmotnost okolo 750 kDa a je to napříč eukaryotickými organismy konzervovaná struktura. Pojmenování 20S nese díky svému sedimentačnímu koeficientu 20 Svedbergů. Proteazóm 20S má dutou válcovou strukturu a skládá se ze čtyř prstenců poskládaných v patrech na sobě.

Vnější prstence se nazývají  $\alpha$  a vnitřní prstence  $\beta$ . Každý prstenec obsahuje sedm podjednotek  $\alpha$  nebo  $\beta$  (Voges *et al.* 1999). Vlastní proteolytickou aktivitu zabezpečují některé  $\beta$  podjednotky:  $\beta 1$  podjednotky zajišťují peptidyl-glutamyl peptidázovou aktivitu (štěpí peptidy za kyselými aminokyselinami),  $\beta 2$  podjednotky vykazují trypsinovou aktivitu (hydrolyzuje peptidovou vazbu za bazickými aminokyselinami) a  $\beta 5$  podjednotky zajišťují chymotrypsinovou aktivitu (štěpí peptidy za hydrofóbními aminokyselinami) (Orlowski a Wilk 2000). Proteazóm 20S tedy obsahuje 6 katalytických podjednotek, 2x  $\beta 1$ , 2x  $\beta 2$  a 2x  $\beta 5$  (Obr. 2.10). Na konci  $\alpha$  podjednotek tvoří fyzickou bariéru proti nežádoucímu vniknutí proteinů do vnitřku proteazómu, tedy do katalytického místa tvořeného  $\beta$  podjednotkami (Groll *et al.* 2000).

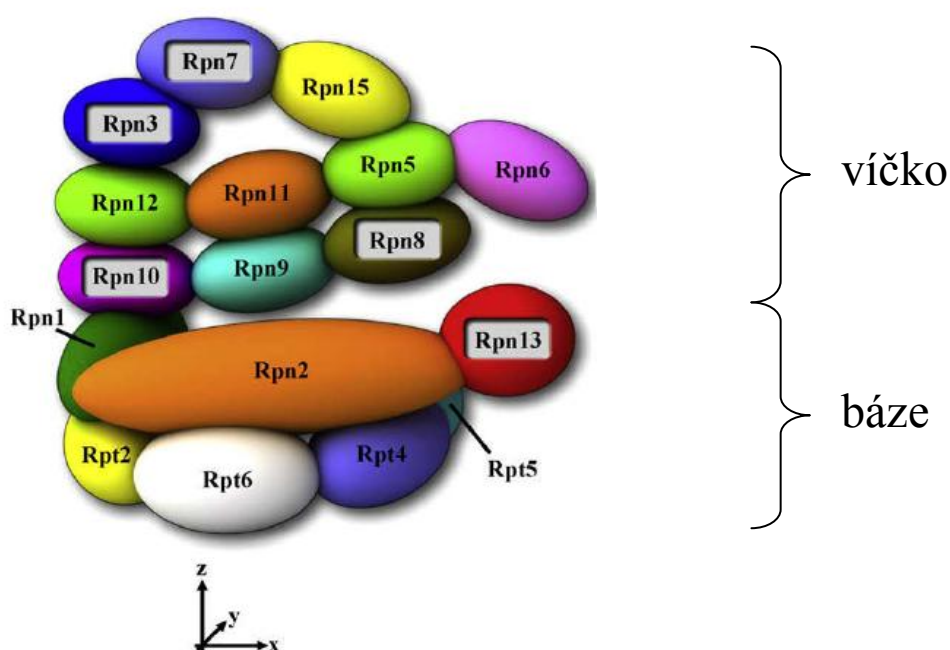


Obr. 2.10: **Schématicky znázorněná struktura 20S proteazómu.** 20S proteazóm je tvořen čtyřmi sedmipodjednotkovými prstenci. Vně se nacházejí prstence s  $\alpha$  podjednotkami a mezi nimi jsou umístěny prstence s  $\beta$  podjednotkami. Vlastní katalytickou aktivitu vykazují podjednotky  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  a  $\beta 5$  (vyznačeny červeně). Upraveno podle Tanaka 2009.

### 2.2.2 Aktivátory 20S proteazómu

V eukaryotických buňkách bylo nalezeno větší množství aktivátorů latentních 20S proteazómů. Tyto aktivátory se váží na  $\alpha$  prstence 20S proteazómu a umožňují výběr a přístup substrátů do 20S (Stadtmueller a Hill 2011). Součástí 26S proteazómů je aktivátor 19S neboli RP nebo také PA700 (Chu-Ping *et al.* 1994, Glickman a Ciechanover 2002). Tato 19S podjednotka se může vázat k 20S proteazómu na jeden či oba konce. Jejímí funkcemi jsou výběr substrátu (rozpoznání a zachycení polyubiquitinylovaných proteinů), jejich příprava pro degradaci (odstranění polyubiquitinového řetězce, rozvolnění substrátových proteinů) a translokace substrátu do 20S proteazómu (otevření  $\alpha$  prstence 20S proteazómu a přenos substrátu do dutiny proteazómu k proteolýze).

19S RP obsahuje dvě skupiny podjednotek obsahujících více rozmanitých proteinů. První skupina jsou tzv. Rpt podjednotky (regulatory particle triple-A protein) vykazující ATPázovou aktivitu a dále pak Rpn podjednotky (regulatory particle non-ATPase), které ATPázovou aktivitu nevykazují (Glickman *et al.* 1998). Strukturu 19S RP můžeme rozdělit na tzv. bázi a víčko. Bázi tvoří proteiny z Rpt a Rpn skupiny a víčko je tvořeno pouze z Rpn proteinů. Hlavní funkce báze RP jsou rozpoznání a zachycení substrátu díky ubiquitinu, rozvolnění substrátu a otevření  $\alpha$  prstence CR. Hlavní funkce víčka je deubiquitinylace zachycených proteinů (Tanaka 2009). Skruktura 19S proteazómu je zobrazena na Obr. 2.11.



Obr. 2.11: **Zjednodušený model struktury 19S regulační částice proteazómu.** 19S RP může být přítomna na jednom či obou koncích 20S proteazómu. Skládá se z tzv. víčka, které tvoří pouze proteiny Rpn a tzv. báze, která je tvořena proteiny Rpn i Rpt. Upraveno podle Jung *et al.* 2009.

Dále byly objeveny také další aktivátory 20S proteazómu: PA200 (neboli Blm10) a PA28 (neboli 11S či REG). PA200 se nachází v jádrech savčích buněk a stimuluje proteazomální hydrolýzu menších oligopeptidů, zdá se však, že není schopen zpracovat přirozeně složené proteiny. Tento aktivátor interaguje s  $\alpha$  podjednotkami 20S proteazómu (kromě  $\alpha 7$ ) a tím indukuje otevření kanálu skrze  $\alpha$  prstence 20S proteazómu (Ortega *et al.* 2005).

PA200 pravděpodobně hraje roli v opravě DNA po vystavení ionizujícímu záření (Ustrell *et al.* 2002). Při ovlivnění buňky ionizujícím zářením dochází k expresi PA200 a ve formě hybridního proteazómu (PA200-CP-PA700) se kumuluje na chromatinu a tam je PA200 pravděpodobně schopen zvýšit peptidyl-glutamyl peptidázovou aktivitu  $\beta$  podjednotek 20S proteazómu (Blickwedehl *et al.* 2007, Blickwedehl *et al.* 2008). Na druhou stranu embryonální kmenové buňky deficientní na PA200 nevykazovaly zvýšenou citlivost na ionizující záření. Nicméně ztráta PA200 vedla ke snížení mužské plodnosti díky defektům ve spermatogenezi (Khor *et al.* 2006).

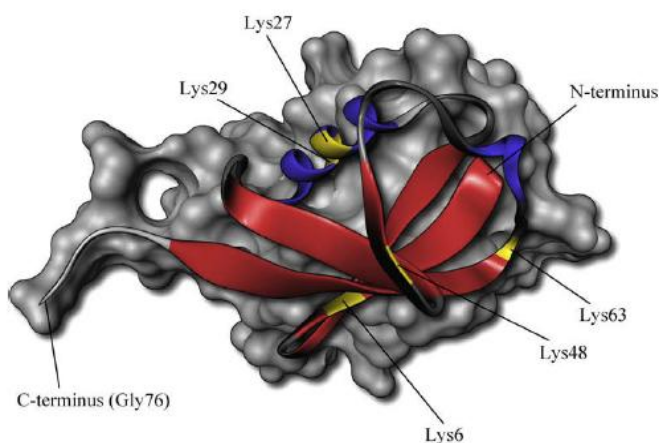
Další aktivátor 20S proteazómu je PA28, který se skládá ze tří různých podjednotek – PA28 $\alpha$ , PA28 $\beta$  a PA28 $\gamma$ . PA28 $\alpha$  a PA28 $\beta$  tvoří heteroheptamerní komplex zvaný též 11S regulátor. Tento komplex je na rozdíl od PA28 $\gamma$  inducibilní interferonem  $\alpha$  a  $\gamma$  (Ahn *et al.* 1996). PA28 $\alpha\beta$  byl nalezen především v imunokompetentních tkáních a zdá se, že tento komplex hraje roli v antigenní prezentaci na MHC I molekulách (Rechsteiner *et al.* 2000). PA28 $\alpha\beta$  byl nalezen v cytoplazmě, jádrech a jadérkách buněk, zatímco PA28 $\gamma$  se nachází zřejmě výhradně v jádrech, ale ne v jadérkách buněk (Soza *et al.* 1997, Wójcik *et al.* 1998). PA28 $\gamma$  aktivuje především trypsin-like aktivitu 20S proteazómů. PA28 $\alpha$  a  $\beta$  pravděpodobně aktivují všechny tři proteolytické aktivity 20S proteazómů (Realini *et al.* 1997).

Shrnu-li dosavadní poznatky, v eukaryotické buňce se nachází samotný 20S proteazóm, který, zdá se, degraduje oxidativně poškozené či špatně sbalené proteiny, které samy dokážou rozvolnit  $\alpha$  prstence 20S proteazómu, uzavírající vstup do katalytických míst proteazómu. Alespoň *in vitro* byla tato schopnost denaturovaných proteinů prokázána (Liu *et al.* 2003, Jung a Grune 2008). V ostatních případech 20S proteazóm pravděpodobně vyžaduje aktivátory, jimiž mohou být 19S RP, PA200 nebo PA28. V eukaryotické buňce pak můžeme nalézt různá seskupení 20S CP a jeho aktivátorů. Proteazóm 20S spolu s 19S RP tvoří 26S proteazóm, který degraduje většinou ubiquitinylované proteiny za spotřeby ATP. Dále můžeme nalézt např. tzv. imunoproteazóm, který obsahuje jednu 20S CP a dva aktivátory 11 S nebo hybridní proteazóm obsahující 1x 20S CP, 1x 11S a 1x 19S (Jung *et al.* 2009).

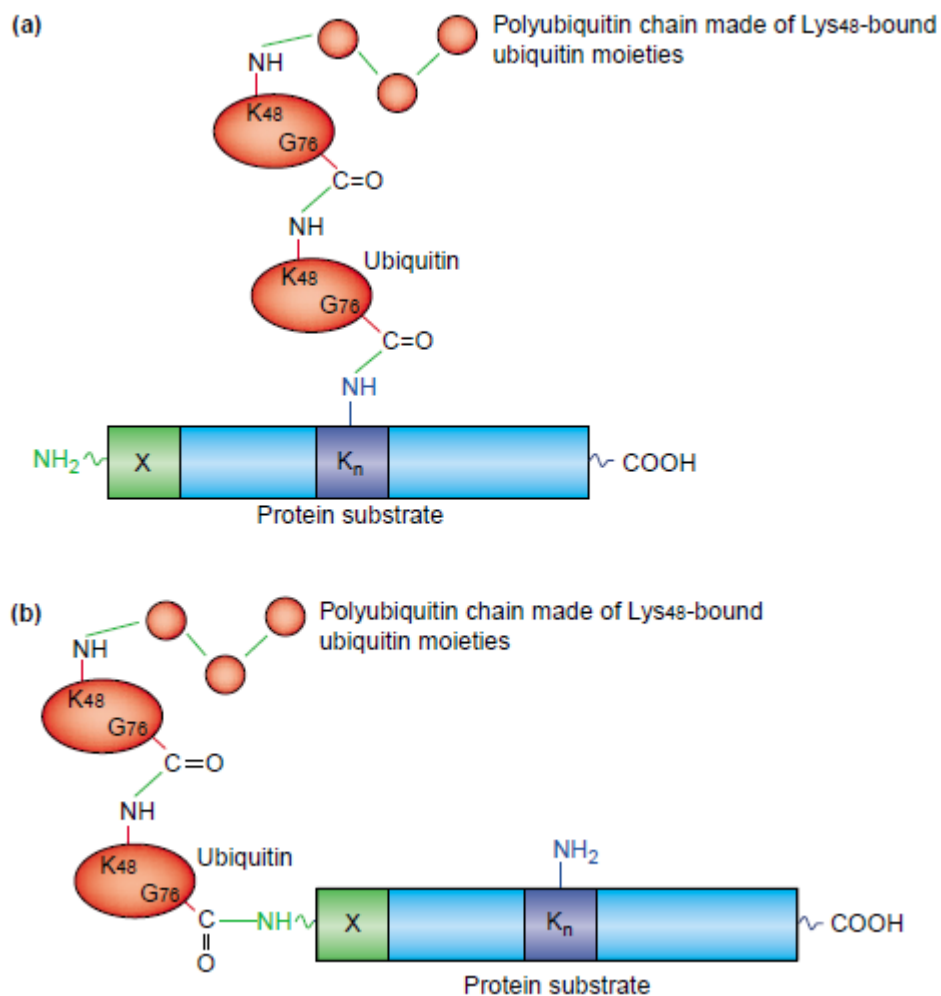
Také bylo popsáno několik málo případů degradace proteinu v 26S proteazómu bez polyubiquitylace. Asi nejznámějším příkladem je ornitin dekarboxyláza (ODC), klíčový enzym v biosyntéze polyaminů. Pokud vzniká příliš mnoho polyaminů, dojde k indukci vzniku ODC antizymu, inhibitoru ODC. Právě vazba antizymu na ODC zprostředkuje jeho degradaci v 26S proteazómu (Murakami *et al.* 1992, Murakami *et al.* 2000).

### 2.2.3 Ubiquitin a ubiquitinylace

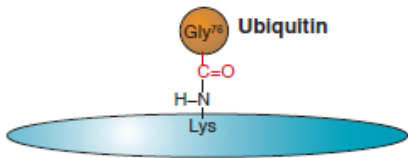
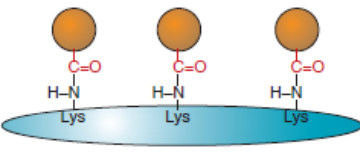
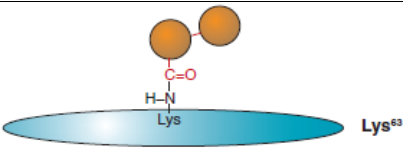
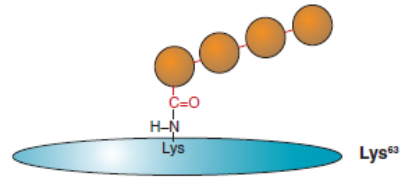
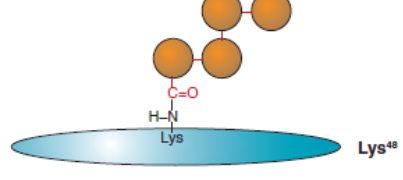
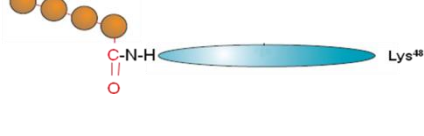
Ubiquitin je malý globulární protein o velikosti 76 aminokyselin a molekulární hmotnosti 8,6 kDa (Obr. 2.12). Napříč eukaryotickými organismy je velmi konzervovaný. Nachází se v buňce buď ve formě volného ubiquitinu nebo je vázaný k buněčným proteinům. Vazba na proteiny je uskutečněna mezi glycinem76 ubiquitinu (C konec) a některým internálním lyzinem ubiquitinylovaného proteinu (N konec) či N terminálním aminokyselinovým zbytkem proteinu (Ciechanover a Ben-Saadon 2004). Jednotlivé ubiquitiny jsou vzájemně propojeny vazbou mezi Gly76 a některým lyzinem ubiquitinu (Obr. 2.13). Ubiquitinylace je reverzibilní posttranslační modifikace. Její funkce jsou různé podle typu ubiquitinylace, záleží na počtu připojených ubiquitinů a na tom, přes který lyzin jsou navzájem ubiquitiny v polyubiquitinovém řetězci pospojovány (Miranda a Sorkin 2007) (Tab. 2.1). Většina efektů ubiquitinylace je zprostředkována ubiquitin vazebnými doménami (ubiquitin binding domains, UBDs). Tyto domény se nacházejí v mnoha proteinech (Hurley *et al.* 2006). Deubiquitinylaci zajišťují deubiquitinylační enzymy DUBs (deubiquitinating enzymes), které odstraní ubiquitinový řetězec z proteinu a rozdělí molekuly ubiquitinu v multiubiquitinovém řetězci. DUBs jsou důležité pro udržení dostatečné hladiny volného ubiquitinu v buňce (D'Andrea a Pellman 1998).



Obr. 2.12: **Model molekuly ubiquitinu.** Ubiquitin je malá molekula čítající 76 aminokyselin. Svým C koncem (Gly76) se váže na cílové proteiny. Lyziny, na které je možno připojit další molekulu ubiquitinu jsou vyznačeny žlutě. Převzato z Jung *et al.* 2009.



Obr. 2.13: **Způsob připojení ubiquitinu k proteinům.** A) První ubiquitin je připojen k proteinu přes N konec internálního lyzinu ubiquitinylovaného proteinu a C konec glycinu76 ubiquitin. B) První ubiquitin je navázán svým C koncem glycinu76 na N terminální aminokyselinový zbytek cílového proteinu. V obou případech jsou vzájemně jednotlivé molekuly ubiquitinu spojeny přes lyzin48, což slouží jako signál pro degradaci. Převzato z Ciechanover a Ben-Saadon 2004.

Typ ubiquitylace	Funkce	Obrázek
monoubiquitylace	endocytóza, endozomální sorting, opravy DNA, regulace histonů, jaderný export, pučení retrovirů	
multi-monoubiquitylace	endocytóza	
di-ubiquitylace proteinu přes Lys63	endocytóza, membránový trafficking, signální transdukce	
polyubiquitylace proteinu přes Lys63	endocytóza, oprava DNA, aktivace protein kináz, ribosomální funkce	
polyubiquitylace proteinu přes Lys48	degradace v proteazómu (26S)	
N terminální ubiquitylace přes Lys48	degradace v proteazómu	

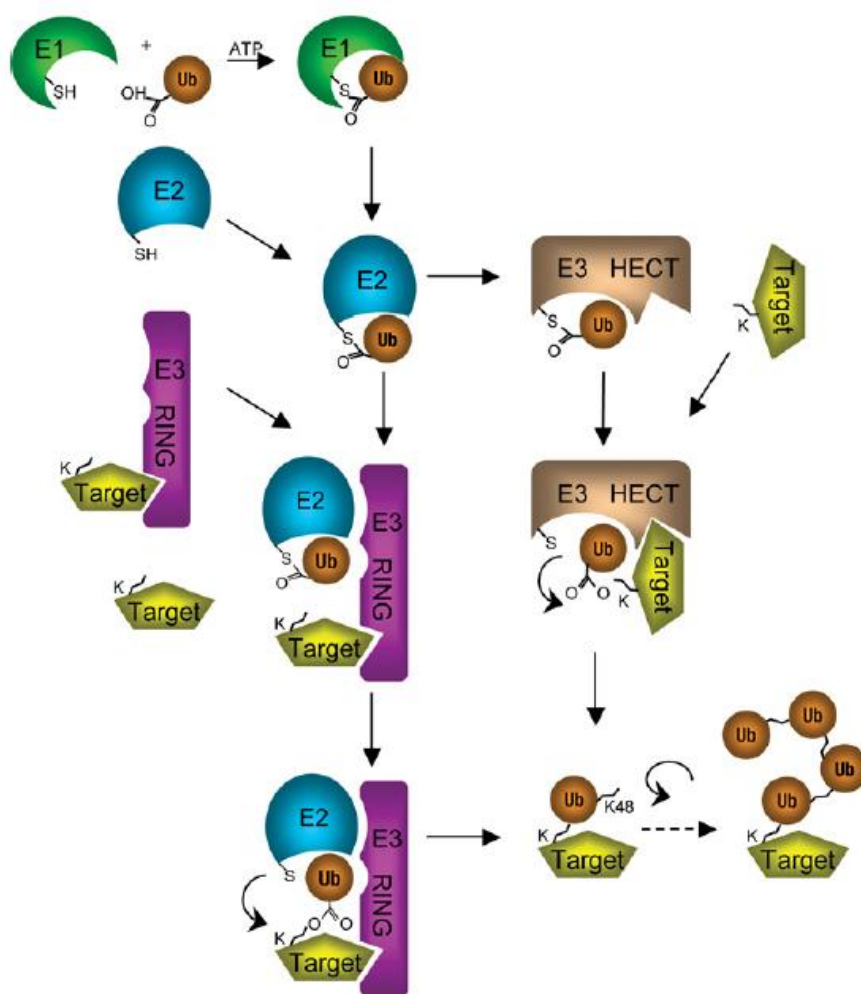
Tab. 2.1: **Přehled typů a funkcí ubiquitylací proteinů.** Počet navázaných molekul ubiquitinů a pořadí lyzinu, přes který jsou molekuly ubiquitinů v polyubiquitinovém řetězci navzájem spojeny předurčuje osud ubiquitylovaného proteinu. Upraveno podle Miranda a Sorkin 2007, Ciechanover a Ben-Saadon 2004.

Kovalentní připojení ubiquitinů k substrátovému proteinu je zajištěno kaskádou enzymů. Jako první se uplatňuje ubiquitin aktivující enzym (E1), dojde k připojení ubiquitinů do aktivního místa E1. E1 aktivuje C konec (Gly76) ubiquitinů za spotřeby ATP. Dvoukroková reakce vyústí ve vznik vysokoenergetického meziproductu E1-thiol-ester~ubiquitinů (Haas *et al.* 1982). Zatím bylo popsáno osm E1 enzymů (Groettrup *et al.* 2008). Následně dochází k přenosu aktivovaného ubiquitinů na ubiquitin konjugací (přenášející) enzym (E2).



Zde je opět C konec ubiquitinu připojen k cysteinovému zbytku E2 enzymu přes thioesterovou vazbu. E2 přenesení aktivovaný ubiquitin na enzym ubiquitin ligázu (E3) nebo přímo na substrát. E2 enzymů je více a každý je zodpovědný za aktivaci speciální sady E3 enzymů. E3 enzymy váží specifický substrát a ubiquitinylace substrátu je uskutečněna v komplexu, kde je přítomen E2 enzym s navázaným aktivovaným ubiquitem a konkrétní E3 enzym s navázaným specifickým substrátem. E3 ligázy můžeme rozdělit na dvě skupiny. Jedna skupina E3 enzymů obsahuje HECT (homology to E6-associated protein C-terminus) doménu a v tomto případě je aktivovaný ubiquitin nejdříve přenesen na E3 enzym a až poté na substrát. U E3 ligáz obsahujících RING (really interesting new gene) doménu je ubiquitin přenesen z E2 enzymu rovnou na substrát. V tomto případě slouží E3 enzymy jako lešení pro E2 a substrát a stejně jako HECT E3 enzymy jsou zodpovědné za výběr substrátu (shrnutí v Glickman a Ciechanover 2002). E3 enzymů je velmi mnoho, odhaduje se několik set (Wong *et al.* 2003). Mašinerie enzymů E1, E2 a E3 zodpovědná za ubiquitinylaci proteinů je zobrazena na Obr. 2.14. Dále byla objevena další skupina enzymů, nazývána E4. E4 je skupina specializovaných enzymů, které ve spolupráci s E1, E2 a E3 enzymy prodlužují ubiquitinový řetězec (Koegl *et al.* 1999, Hoppe 2005). Mašinerie enzymů E1, E2 a E3 vykazuje hierarchickou strukturu. Jeden E1 katalyzuje aktivaci ubiquitinu a tento ubiquitin je přenesen na několik E2 enzymů, přičemž ve většině případů jeden E2 spolupracuje s více E3 a nakonec jeden E3 může většinou rozpoznávat více substrátů na základě jejich podobných motivů (Ciechanover 1998). Jak přesně E3 ligázy rozpoznávají „svůj“ specifický substrát není zcela jasné, ale může se tak dít na základě více principů. E3 ligázy mohou rozpoznat specifický substrát díky jeho aminokyselinové sekvenci na N konci (tzv. N koncové pravidlo), díky fosforylaci substrátu, díky abnormální struktuře substrátu či díky pomocnému proteinu, který například alostericky aktivuje E3 ligázu a ta je následně schopna substrát vázat (Glickman a Ciechanover 2002). Signály pro degradaci se nazývají degrony (Ravid a Hochstrasser 2008).



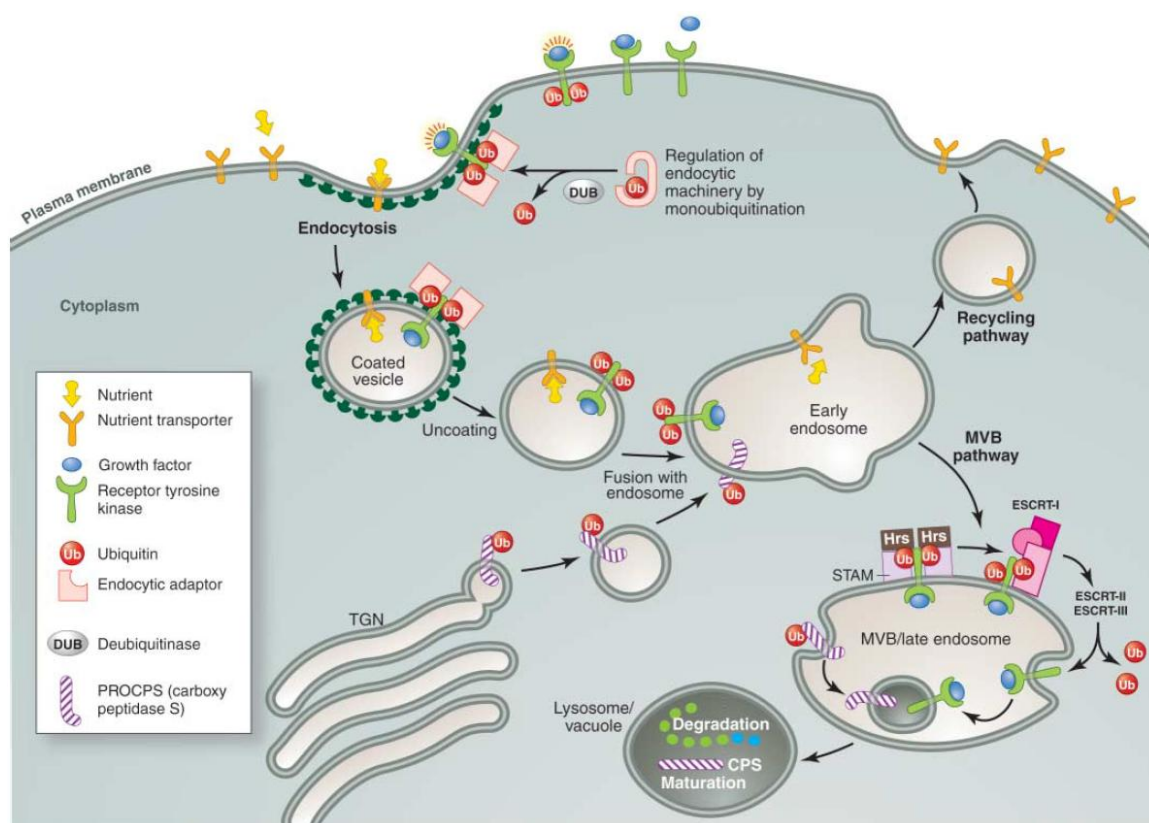


Obr. 2.14: **Model ubiquitinylace cílových proteinů.** Na ubiquitinylace proteinů se podílí enzymy E1 - ubiquitin aktivující enzym, E2 - ubiquitin konjugiční (přenášející) enzym a E3 – ubiquitin ligáza. Na obrázku je znázorněna polyubiquitinylace přes lyzin 48, což je signál pro degradaci v 26S proteazómu. Za prodloužení ubiquitinového řetězce je pravděpodobně zodpovědný enzym E4. Převzato z Hurley *et al.* 2006.

#### 2.2.4 Ubiquitinylace jako signál pro endocytózu

Ubiquitinová značka pro endocytózu může být monoubiquitinylace, multi-monoubiquitinylace, ale i polyubiquitinylace (i di-) přes Lys63. Nejdříve byla objevena schopnost ubiquitinu sloužit jako signál pro internalizaci membránových receptorů u kvasinek (Hicke a Riezman 1996). Autoři ukázali, že vazba specifického ligandu na receptor spážený s G proteiny aktivovala přenos signálu buňkou a stimulovala ubiquitinylace receptoru vedoucí k endocytóze komplexu ligand-receptor. Následně dochází pravděpodobně k degradaci komplexu v lysozómu.

Dále bylo zjištěno, že k ubiquitylaci receptorů následovanou endocytózou dochází i v savčích buňkách (Mori *et al.* 1993). Ubiquitylace může sloužit jako signál pro transport proteinů plazmatické membrány z časného endozómu do multivezikulárních tělísek (multivesicular body - MVB), odkud jsou proteiny transportovány do lyzozómu (Mukhopadhyay a Riezman 2007) (Obr. 2.15). Role ubiquitinů v regulaci savčích membránových proteinů byla popsána u řady různorodých skupin proteinů, jako jsou iontové kanály, receptorové tyrosin kinázy, cytokinové receptory či receptory spřažené s G proteiny (Staub a Rotin 2006).



Obr. 2.15: Ubiquitylace jako signál pro endocytózu a sorting do multivezikulárních tělísek. Mnoho proteinů plazmatické membrány je ubiquitylováno na své cytoplasmatické části a jsou internalizovány do buňky. Z časných endozómů jsou neubiquitylované proteiny recyklovány zpět na plazmatickou membránu a ubiquitylované proteiny jsou cíleny do MVB a odtud do lyzozómů, kde jsou degradovány. Cestu z časných endozómů přes MVB do lyzozómů můžou také díky ubiquitylaci využívat i proteiny určené k biogenezi lyzozómů. Převzato z Mukhopadhyay a Riezman 2007.

### 2.2.5 Degradace proteinů asociovaná s endoplazmatickým retikulem (ERAD)

ERAD dráha zajišťuje odstranění nekvalitních nově nasyntetizovaných proteinů. Pokud jsou proteiny v ER špatně složeny, dochází k jejich transportu z ER do cytoplazmy, jejich ubiquitylaci a následné degradaci proteazómem. Nově vzniklé nascentní proteiny jsou translokovány do lumen ER a tam dochází k posttranslačním úpravám proteinů pomocí enzymů a molekulárních chaperonů ER. Právě v ER dochází ke kontrole kvality nově vzniklých proteinů, eventuálně následované jejich zadržením v ER a/nebo degradací nekvalitních proteinů (Hammond a Helenius 1995, Kostova a Wolf 2003). ERAD dráha díky degradaci nesprávně složených proteinů pomáhá udržovat buněčnou homeostázi a je esenciální pro správný chod organismu. Mnoho ERAD substrátů je spojeno s lidskými chorobami (Aridor 2007) a kumulace nedegradovaných substrátů ERAD má za následek odpověď způsobenou nesloženými proteiny, tzv. unfolded protein response (UPR), která může vést k apoptóze buňky (Ron a Walter 2007).

Nejprve musí být nesprávně složený protein rozpoznán a nasměrován do retrotranslokony. Tuto funkci mají na starost chaperony nacházející se v ER. Chaperony BiP (nebo-li Grp78) a Jem1p a Scj1p (Hsp40 like proteiny) (všechny patří do skupiny heat shock proteinů) se snaží zabránit vytváření nerozpustných agregátů, které jsou tvořeny nesprávně složenými proteiny díky jejich hydrofobním úsekům exponovaných na povrch (Nishikawa *et al.* 2001). Tyto nerozpustné agregáty by neprošly translokou do cytoplazmy. Proteiny zodpovědnými za rozpoznání substrátů ERAD dráhy, špatně sbalených proteinů, se zdá, že jsou také protein disulfid izomeráza (PDI) (Gillece *et al.* 1999) a Eps1p, transmembránový protein z rodiny PDIs (Wang a Chang 2003).

Co se týče kontroly kvality proteinů ER, nejvíce je známo o glykoproteinech. Ty jsou během syntézy proteinu nebo vzápětí po translokaci proteinu do ER N koncově glykosylovány. Následně jsou dvě ze tří koncových glukóz odštěpeny a glykoprotein vstupuje do calnexin-calreticulinového cyklu, který pomůže glykoproteinu zaujmout správnou konformaci. Oxidoreduktáza Erp57 (nebo-li GRp58) pomáhá vazbě substrátu s calnexinem a calreticulinem (Ellgaard a Frickel 2003). Po odstranění posledního glukózového zbytku je glykoprotein uvolněn z calnexin-calreticulinového cyklu (Roth *et al.* 2008) a pokud je správně složen, opouští ER směrem ke GA. Pokud ne, vstupuje podruhé do calnexin-calreticulinového cyklu díky de- a následné re-glykosylaci. ER manozidáza I po určité době odštěpí ze substrátů v calnexin-calreticulinovém cyklu některou terminální manózu (Jakob *et al.* 1998).

Takto upravené glykoproteiny jsou rozpoznávány proteiny EDEM rodiny (ER degradation enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like proteins), uvolněny z calnexin-calreticulínového cyklu (Hosokawa *et al.* 2001, Molinari *et al.* 2003, Oda *et al.* 2003), retrotranslokovány do cytoplazmy a degradovány proteazómem.

Dalším krokem v ERAD dráze je retrotranslokace špatně sbalených proteinů do cytoplazmy. Tento proces není plně objasněn, ale některé informace známy již jsou. Na retrotranslokaci proteinů se může podílet komplex Sec61 (Wiertz *et al.* 1996), kterým jsou také nově syntetizované proteiny doručovány do lumen ER (Rapoport 2007). Protein procházející komplexem Sec61 musí být pravděpodobně rozvolněn (Tsai *et al.* 2001). Jiný kanál pro retrotranslokaci by mohl být tvořen proteiny Derlin-1 a ATPázou p97 (nebo-li Cdc48p či VCP-valosin containing protein) (Halawani a Latterich 2006, Sun *et al.* 2006). Některé proteiny zřejmě podstupují ubiquitin nezávislou retrotranslokaci a až v cytoplazmě jsou polyubiquitinylovány a degradovány v proteazómu. Proteiny mající defekt v transmembránové části mohou být translokovány odlišným mechanismem, kdy nejprve dochází k ubiquitylaci proteinu, následovanou retrotranslokací do cytoplazmy, prodloužením polyubiquitinové značky a degradací v proteazómu. V některých případech je retrotranslokace úzce spřažena s degradací proteinu a k degradaci cytoplazmatické části transmembránového proteinu by mohlo docházet ještě ve chvíli, kdy je tento protein v membráně ER (Nakatsukasa a Brodsky 2008). Při typu retrotranslokace, kdy je poškozený protein ještě před translokací ubiquitinylován se uplatňuje ATPáza Cdc48p a kofaktory Npl4 a Ufd1 (ubiquitin binding faktory) (Ye *et al.* 2001, Jarosch *et al.* 2002). Topologie defektů poškozeného proteinu pravděpodobně předurčuje cestu proteinu ERAD dráhou (Vashist a Ng 2004). Polyubiquitylace proteinů se účastní ubiquitin konjugační enzymy Ubc6p a/nebo Ubc7p (Biederer *et al.* 1996, Hiller *et al.* 1996) a E3 ubiquitin ligázy Hrd1p a Doa10p (Hampton 2002). Ubc6p je transmembránový protein a Ubc7p je asociovaný s membránou ER díky proteinu Cue1p (Biederer *et al.* 1997). Polyubiquitinylované substráty jsou degradovány v 26S proteazómu.

## 2.3 INTERAKCE VIRŮ S PROTEAZOMÁLNÍ SYSTÉMEM

Viry nestále soupeří s hostitelskými buňkami o rychlejší a efektivnější obranu proti soupeři. Buňka se snaží různými mechanismy zabránit úspěšnému pomnožení viru a virus naopak využívá řadu mechanismů jak buněčným obranným systémům uniknout a navíc jak využít buněčné komponenty a dráhy ve svůj prospěch. Toto se týká i proteazomálního systému buňky, který viry zneužívají ve svůj prospěch na různých úrovních. Dále je uvedeno několik známých příkladů zneužití hostitelského proteazomálního systému viry. Nutno ovšem podotknout, že rozsah publikovaných prací na tomto poli je do značné míry omezený. Výzkum se zaměřuje převážně na konkrétní viry (HIV) či izolované procesy (pučení viru, blokace apoptózy), zatím co jiné virové skupiny a procesy virových životních cyklů zůstávají z tohoto hlediska zcela neprobádané.

### 2.3.1 Zneužití hostitelského proteazomálního systému k úniku imunitnímu systému

Přestože obratlovci vyvinuli sofistikovaný imunitní systém pro eliminaci virem infikovaných buněk, viry dokážou perzistovat v organismu po dlouhou dobu. Běžným mechanismem pro únik imunitnímu systému je potlačení prezentace antigenů pomocí MHC I molekul (Furman a Ploegh 2002). Například proteiny US2 a US11, kódované lidským cytomegalovirem indukují degradaci MHC I molekul. Tyto molekuly jsou dislokovány z ER do cytoplazmy, přičemž pro dislokaci je nutná ubiquitinylace MHC I molekul. Po přesunu jsou následně MHC I molekuly degradovány v proteazómu (Kikkert *et al.* 2001, Shamu *et al.* 2001). Tato degradace MHC I molekul vyvolaná proteiny US2 a US11 připomíná ERAD dráhu. Dále bylo zjištěno, že EBNA1 protein viru Epstein-Barrové (Epstein-Barr virus encoded nuclear antigen 1), který je produkován v latentní fázi virového cyklu, je rezistentní k proteolytické degradaci proteazómem a tím pádem jeho fragmenty nemohou být vystaveny na MHC I molekulách. Za tuto rezistenci jsou zodpovědné úseky opakování glycinu a alaninu v proteinu EBNA1 (Levitskaya *et al.* 1997).

Byly popsány i jiné mechanismy destrukce MHC I molekul. V mnoha virových proteinech byl nalezen PHD (plant homeodomain) motiv, který je úzce příbuzný RING doménám v E3 ubiquitin ligázách. Proteiny s těmito doménami mohou fungovat jako E3 ubiquitin ligázy, ubiquitinylovat proteiny plazmatické membrány, v tomto případě proteiny hrající roli v protivirové imunitě a zajistit tak jejich endocytózu s následnou degradací v lysozómu.

Tuto schopnost mají například proteiny MIR1 (neboli K3) a MIR2 (neboli K5) lidského herpes viru 8 (herpes virus asociovaný s Kaposiho sarkomem), které takto indukují destrukci MHC I molekul a také B7 a ICAM-1, které jsou důležité pro kostimulaci T lymfocytů (Coscoy a Ganem 2000, Coscoy *et al.* 2001). Také protein M153R myxomaviru obsahuje PHD doménu a indukuje pomocí ubiquitinylace degradaci CD4 molekul v T lymfocytech (Mansouri *et al.* 2003).

Tat protein viru HIV-1 brání degradaci svých proteinů a tak jejich vystavení na povrchu MHC I molekul tím, že je schopen se vázat na  $\alpha$  podjednotky 20S proteazómu místo aktivátoru 11S. Tat protein se také váže na  $\beta$  podjednotky 20S proteazómu. Těmito interakcemi brání Tat protein proteazomální aktivitě. Komplex 20S a 11S generuje antigenní peptidy (Seeger *et al.* 1997, Apcher *et al.* 2003).

### **2.3.2 Virové proteiny jako součást E3 ubiquitin ligáz**

Vůbec první objev zneužití proteazomálního systému viry byl učiněn na proteinu E6 lidského papillomaviru 16 a 18 (HPV 16 a HPV 18) (Scheffner *et al.* 1990). Protein E6 je schopen se vázat na buněčný protein E6-AP (E6 associated protein), tento komplex pak slouží jako E3 ubiquitin ligáza, která ubiquitinyluje buněčný protein p53, což má za následek jeho degradaci v proteazómu (Scheffner *et al.* 1993). p53 může představovat hlavní překážku v replikaci malých tumorogenních DNA virů, mezi něž patří Adenoviry, Polyomaviry a Papillomaviry. Aktivace p53 následovaná po infekci by vyústila v inhibici replikace buněčné i virové DNA a předčasné buněčné smrti, která by znemožnila viru dokončit svůj reprodukční cyklus. Degradaci p53 zabrání E6 protein vstupu buňky do apoptózy.

Dva adenovirové proteiny E1B55K a E4orf6 snižují stabilitu p53 tím, že s ním interagují a směřují tento protein na degradační dráhu. E4orf6 může tvořit komplex s buněčnými proteiny Cul5, elonginy B a C a Rbx1, tento komplex je E3 ubiquitin ligáza založená na cullinu (Querido *et al.* 2001). Protein E1B55K funkčně interaguje s proteinem E4orf6. Rolí proteinu E1B55K je pravděpodobně rozpoznání substrátu (Roth *et al.* 1998). Byly nalezeny také další substráty E4orf6-E1B55K ubiquitin ligázového komplexu. Mezi ně patří komponenty MRN komplexu, který se podílí na opravách DNA. Protein Mre11, který je součástí MRN komplexu je pravděpodobně přímým substrátem ligázového komplexu E4orf6-E1B55K a v nepřítomnosti Mre11 jsou Rad50 a NBS1, další dvě komponenty MRN komplexu, nestabilní.

Dalším substrátem E4orf6-E1B55K ubiquitin ligázového komplexu je DNA ligáza IV, která je díky této interakci degradována v proteazómu. Degradace Mre11 a DNA ligázy IV zabráňuje tvorbě konkatemerů adenovirového genomu, který by se takto nemohl zabalit do nově vznikajících virionů (Stracker *et al.* 2002, Baker *et al.* 2007, Schwartz *et al.* 2008).

### 2.3.3 Virové proteiny, které inhibují E3 ubiquitin ligázy

Bylo ukázáno, že protein LT viru SV40 je schopen vázat komponentu SCF<sup>Fbw7</sup> ubiquitin ligázy Fbw7 (neboli Sel-10, hCdc4 či hAgo), která je zodpovědná za rozpoznání substrátu (Welcker a Clurman 2005). Fbw7 se účastní degradace několika proteinů buněčného cyklu, jako jsou cyklin E, c-Myc, c-Jun nebo Notch (Wu *et al.* 2001, Nateri *et al.* 2004, Yada *et al.* 2004, Ye *et al.* 2004). Fbw7 rozpoznává substráty díky fosforylovanému motivu v proteinech, fosfodegronu. Takový motiv obsahuje také LT antigen na svém C konci. Protein LT nicméně není degradován za pomoci SCF<sup>Fbw7</sup> ubiquitin ligázy, ale spíše působí jako kompetitivní inhibitor fyziologických substrátů SCF<sup>Fbw7</sup> ubiquitin ligázy. Význam této inhibice je pravděpodobně v usnadnění virové replikace či možná transformace, ale přesné molekulární aspekty zatím známy nejsou (Welcker a Clurman 2005).

Bylo ukázáno, že velký T antigen viru SV40 může také interagovat s ubiquitin ligázou Cul7. Tato interakce je potřebná pro buněčnou transformaci vyvolanou SV40, ale přesný mechanismus tohoto jevu nebyl dosud objasněn. Jednou z možností je, že T antigen svou vazbou k Cul7 blokuje jeho potenciální tumor supresorové aktivity (Kasper *et al.* 2005). Na druhou stranu bylo ukázáno, že interakce proteinu LT SV40 s Cul7 hraje roli v proteazomální degradaci MRN komplexu a takto vyvolaná deplece MRN komplexu by mohla přispívat k transformační aktivitě viru SV40 (Zhao *et al.* 2008).

### 2.3.4 Ubiquitinylace nutná pro pučení virů z buňky

Bylo popsáno, že ubiquitinylace je nutná pro vypuštění některých obalených RNA virů jako jsou retroviry (Patnaik *et al.* 2000). Pro toto uvolnění nově vzniklých virionů z buňky je esenciální virový protein Gag. L doména Gag proteinu může interagovat s hostitelskými ubiquitinylačními enzymy, konkrétně s E3 ubiquitin ligázou Nedd4 rodiny (Kikonyogo *et al.* 2001). Gag protein také váže protein Tsg101 (tumor susceptibility gene 101), který je schopen vázat monoubiquitinylované proteiny a normálně hraje roli v biogenezi multivezikulárních tělísek.

Pokud byla použita siRNA proti Tsg101, došlo k významnému snížení pučení nově vzniklých virových částic HIV-1 z infikovaných buněk (Garrus *et al.* 2001). Inhibice proteazómů má negativní vliv na uvolňování virového potomstva, protože dojde k vyčerpání volného ubiquitinu, což zabraňuje monoubiquitylaci virového proteinu Gag (Patnaik *et al.* 2000, Schubert *et al.* 2000, Strack *et al.* 2000).

### **2.3.5 Proteazomální systém, ubiquitin a transport virů z plazmatické membrány do jádra**

Bylo ukázáno, že některé viry jsou schopné využívat proteazomální systém ve svůj prospěch během svého transportu do jádra. Takovým příkladem je parvovirus Minute virus of mice (MVM), který patří mezi malé neobalené DNA viry. Použití proteazomálních inhibitorů vedlo k silné inhibici MVM infekce. MVM prochází během své cesty od plazmatické membrány k jádru endozómy. Po opuštění endozómů virus interaguje s buněčnými proteazómy. V buňkách ošetřených inhibitorem proteazómů MG-132 MVM nebyl schopen proniknout do jádra, viriony zůstaly v perinukleární oblasti bez rozvolnění kapsidy. Po odmytí reverzibilního inhibitoru proteazómů byl MVM opět schopen penetrovat do jádra a replikovat se (Ros *et al.* 2002, Ros a Kempf 2004).

Také Herpes simplex virus (HSV, patří mezi obalené DNA viry) využívá proteazomální systém pro doručení svých kapsid do jádra. Při použití proteazomálních inhibitorů došlo k inhibici časně fáze infekce HSV v době po penetraci viru do cytoplazmy, ale před dosažením kapsidy perinukleární oblasti. Tento inhibiční efekt byl reverzibilní a byl zrušen po odstranění inhibitoru proteazómu. HSV využívá pro vstup do buňky endocytické i neendocytické dráhy, přičemž obě tyto dráhy jsou pravděpodobně závislé na proteolýze zprostředkované proteazómem. Tato časná fáze infekce HSV se ale ukázala být nezávislou na ubiquitinu (Delboy *et al.* 2008).

Také bylo ukázáno, že virus chřipky (patří mezi obalené RNA viry) potřebuje ubiquitin-proteazomální systém ke správnému endozomálnímu sortingu během dopravy svého genomu do jádra. Virus chřipky vstupuje do buňky endocytózou a potřebuje nízké pH časných i pozdních endozómů pro úspěšnou infekci. V přítomnosti proteazomálních inhibitorů byly vstupující viry chřipky zadržovány v endozómech a inhibitory proteazómů měly negativní vliv na časná stadia virové replikace. Je pravděpodobné, že ubiquitylace hraje roli během endocytózy viru chřipky a má za následek cílení viru do multivezikulárních tělísek.



Existují negativní regulátory endozomálního sortingu, které jsou normálně ubiquitinylovány a degradovány proteazómem, ale v přítomnosti proteazomálního inhibitoru pravděpodobně k této degradaci nedochází a inhibitor proteazómů by takto mohl bránit úspěšné infekce buňky virem chřipky (Khor *et al.* 2003).

Pro některé viry je naopak proteazomální systém překážkou při jejich cestě do jádra hostitelských buněk. Například u adeno-asociovaného viru (AAV), který patří mezi parvoviry, bylo pozorováno velké zvýšení účinnosti transdukce rekombinantním adenoasociovaným virem v přítomnosti inhibitoru proteazómů. Toto bylo dokázáno na základě pokusů s rekombinantním adenoasociovaným virem, který nesl reportérový gen luciferázu nebo zelený fluorescenční protein (GFP). Tímto rekombinantním virem byly buňky transdukovány a následně byla sledována účinnost transdukce v přítomnosti inhibitoru proteazómů. Také bylo objeveno, že AAV kapsidové proteiny jsou ubiquitinylovány (Douar *et al.* 2001, Yan *et al.* 2002).

Proteazómy jsou překážkou také pro časnou fázi infekce retrovirem HIV. Při použití proteazomálních inhibitorů během časně fáze cyklu HIV došlo ke zvýšené účinnosti infekce a také k akumulaci vstupujících cytoplazmatických p24<sup>gag</sup> proteinů a k syntéze většího množství provirové DNA. Bylo ukázáno, že 20S proteazómy degradovaly složky HIV virionu *in vitro* (Schwartz *et al.* 1998).

### **2.3.6 Vliv proteazomálního systému a ubiquitinu na virovou replikaci, transkripci a translaci**

V některých případech může být ubiquitin důležitý pro regulaci virové transkripce. Je tomu tak například v případě Tat proteinu viru HIV-1, který funguje jako transaktivátor aktivující HIV-1 long terminal repeat (LTR) adaptací koaktivátorových komplexů k promotoru. Ubiquitylace Tat proteinu pozitivně ovlivňuje jeho transkripční vlastnosti, aniž by ho směřovala na proteazomální degradaci (Bres *et al.* 2003).

U více virů bylo popsáno, že funkční ubiquitin-proteazomální systém je nezbytný pro virovou replikaci, transkripci i translaci. Příkladem může být Cocksackievirus B3, který patří mezi Picornaviry (neobalené RNA viry). Pokud byly buňky ošetřeny inhibitorem proteazómů, došlo k výraznému snížení titru viru, hladiny virové RNA a proteinů a nedošlo k virem indukované buněčné smrti. Efekt proteazomální inhibice nebyl prokázán na úrovni vstupu viru do buňky, ale na úrovni replikace virové RNA prostřednictvím inhibice virové RNA transkripce a translace (Luo *et al.* 2003).

Negativní vliv proteazomální inhibice na virovou replikaci a expresi středních a pozdních genů byl pozorován také u viru vakcínie (patří mezi poxviry, obalené DNA viry). Díky různým časům přidání a odmytí proteazomálního inhibitoru autoři zjistili, že tato inhibice nejvíce ovlivňuje virus 2-4 hpi, kdy dochází k syntéze DNA. Exprese časných genů, na rozdíl od středních a pozdních genů, nastala, ale se zpožděním. Negativní vliv proteazomální inhibice na rozvolnění virové kapsidy autoři vyloučili transfekcí plazmidu s poxvirovou DNA, kdy bylo také pozorováno potlačení replikace. Pokud byl proteazomální inhibitor odmyt, došlo opět k replikaci virové DNA a syntéze pozdních proteinů. Také bylo ukázáno, že inhibice ubiquitin aktivujícího enzymu E1 potlačila syntézu pozdních virových proteinů (Satheshkumar *et al.* 2009, Teale *et al.* 2009).

## 2.4 PROTEAZOMÁLNÍ INHIBITORY

Proteazomální inhibitory jsou výborným nástrojem pro vědecký výzkum mnoha buněčných či virových procesů, ale také pro léčbu různých onemocnění. Inhibitory proteazómů bývají namířeny proti katalytickým aktivitám 20S proteazómů, mohou být reverzibilní (jejich účinek lze odmytím ukončit) a ireverzibilní, kdy je inhibice proteazómů trvalá. Proteazómy také můžeme dělit na syntetické analogy (například MG-132) a přírodní produkty (například ireverzibilní inhibitor epoxomicin nebo lactacystin). Proteazomální inhibitory mohou působit na buňky cytotoxicky v závislosti na koncentraci inhibitoru, délce působení inhibitoru a typu buněk (Kisselev a Goldberg 2001). Bylo ukázáno, že proteazomální inhibitory můžou způsobit zastavení buněčného cyklu ve stádiu G1/S a G2/M v závislosti na koncentraci inhibitoru a že tento efekt je reverzibilní po odmytí inhibitoru (Wójcik *et al.* 1996, Machiels *et al.* 1997). Blíže budou probrány dva inhibitory proteazómů: MG-132 a epoxomicin, která byly použity v pokusech popsanych v této diplomové práci.

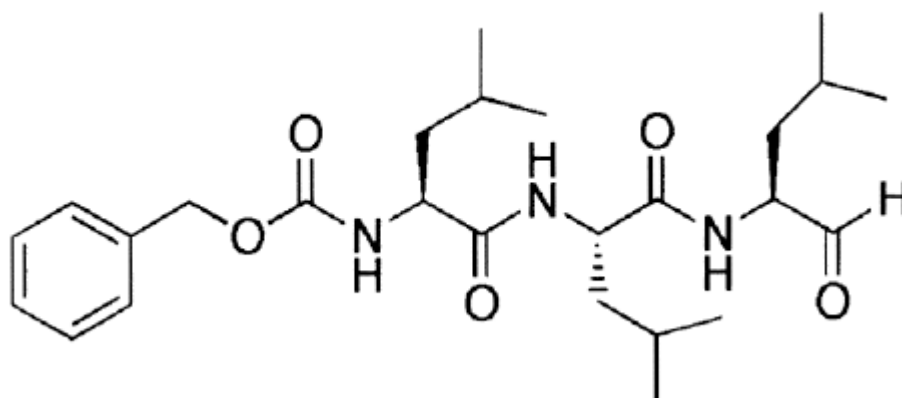
### 2.4.1 MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-al nebo také Cbz-LLL či z-LLL)

MG-132 je reverzibilní proteazomální inhibitor, patřící mezi peptidové aldehydy (Obr. 2.16). Je to jeden z nejvíce používaných inhibitorů proteazómů. MG-132 funguje jako analog substrátu a inhibuje především chymotrypsin-like aktivitu proteazómů. Inhibice této aktivity zajistí značné snížení proteinové degradace, na rozdíl od inhibice trypsin-like a capase-like aktivity, která nemá takový vliv na proteolýzu (Kisselev a Goldberg 2001). Tento inhibitor dobře prochází přes plazmatickou membránu do buňky. MG-132 není bohužel specifický pouze na proteazómy, ale inhibuje také některé lysozomální cysteinové proteázy a kalpainy (Lee a Goldberg 1998). Pokud se inhibitory proteazómů jako jsou peptidové aldehydy odmyjí, je schopnost proteazómů degradovat proteiny plně obnovena jednu hodinu po odstranění inhibitoru (Lee a Goldberg 1996).

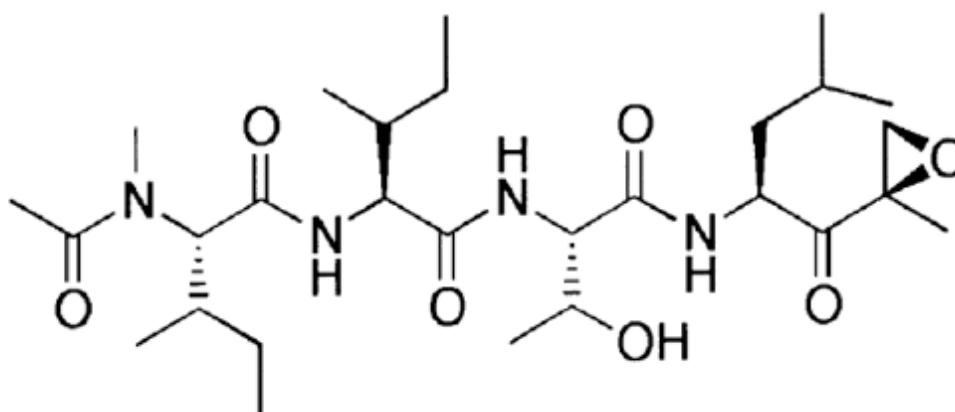
### 2.4.2 Epoxomicin ( $\alpha'$ , $\beta'$ - epoxyketon peptid)

Epoxomicin (Obr. 2.17) je přírodní produkt, který byl poprvé izolován z bakterií rodu *Actinomyces* (Hanada *et al.* 1992). Váže se kovalentní vazbou na  $\beta 5$  podjednotku 20S proteazómu a inhibuje nejvíce chymotrypsinovou aktivitu proteazómů. Trypsinovou a peptidyl-glutamyl peptidázovou aktivitu inhibuje 100-1000x méně.

Epoxomicin je více specifický vůči 20S proteazómu a neinhibuje jiné proteázy jako jsou katepsiny, kalpain, papain, trypsin nebo chymotrypsin. Tento inhibitor je ireverzibilní a dobře proniká plazmatickou membránou (Meng *et al.* 1999, Groll a Huber 2004).



Obr. 2.16: **Reverzibilní proteazomální inhibitor MG-132.** Převzato z Myung *et al.* 2001.



Obr. 2.17: **Ireverzibilní inhibitor proteazómů epoxomicin.** Převzato z Myung *et al.* 2001.

### **3. Materiál a metody**

## 3.1 MATERIÁL

### 3.1.1 Přístroje

Aparatura pro horizontální agarózovou elektroforézu multiSub Mini (Cleaver)

Aparatura pro SDS-PAGE (Hoefer)

Aparatura pro Western blot TE22 (Hoefer)

Centrifuga Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180 (Beckman)

Mikrocentrifuga Microfuge Lite 16, rotor A46544 (Beckman)

Mikrocentrifuga Microfuge Lite, rotor F1802 (Beckman)

Mikrocentrifuga Microfuge R, rotor F241.5 (Beckman)

Mikrocentrifuga MiniSpin plus, rotor IL 016 (Eppendorf)

Centrifuga Megafuge 1.0R (Heraeus Sepatech)

Centrifuga 3K30, rotory 12171, 12154-H, 19776-H (Sigma)

Centrifuga s výkyvným rotorem MSE (MSE)

CO<sub>2</sub> termostat (Forma Scientific)

Elektronový mikroskop JEOL JEM 1200 EX

Elektroporátor Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad)

Fluorescenční mikroskop BX-60 (Olympus)

Fluorescenční invertovaný mikroskop Olympus IX71

Konfokální mikroskop TCS SP2 Laser Scanning Confocal Microscope (Leica)

Kultivační třepačky Orbital Shaker (Forma Scientific), Orbi-Safe TS (Gallenkamp)

Laminární box (Forma Scientific)

PCR cyklér Mastercycler EPgradient S (Eppendorf)

Průtokový cytometr LSR II (BD)

Refraktometr ABBE (Carl Zeiss Jena)

Sonikátor Branson 5 (Cole-Parmer Instrument Company)

Spektrofluorometr Jobin-Yvon Fluoromax3 (Horiba Scientific)

Spektrofotometr Helios β (Thermo Electron)

Spektrofotometr ND – 1000 (NanoDrop)

Termostat TCH 100 (laboratorní přístroje Praha)

Třepačky Duomax 1030 (Heidolph), Mini Labroller, Shaker 30 (Labnet)

Ultracentrifuga Optima TM L-90K, rotory SW 28, SW 41 (Beckman)

UV transluminátor (BioLum)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

Vodní lázeň SUB (Grant)

### **3.1.2 Chemikálie**

Agaróza pro elektroforézu (Amresco)

Agaróza SeaPlaque (FMC Bioproducts)

Akrylamid (Serva)

Amonium persulfát - APS (Serva)

Aprotinin (Sigma)

Bisakrylamid (Serva)

Bovinní sérový albumin - BSA (Sigma)

Bromfenolová modř (Serva)

$\beta$ -merkaptoethanol (Serva)

Cesium chlorid (Serva)

Coomassie Brilliant Blue G250 - CBBG250 (Serva)

Deoxyribonukleosid trifosfáty - dNTPs (Sigma)

Dextran sulfát (Sigma)

Dimethylsulfoxid - DMSO (Sigma)

Dithiothreitol - DTT (Roche)

Dodecylsulfát sodný – SDS (Sigma)

Ethanol - EtOH (Penta)

Ethylendiamintetraacetát disodný - EDTA (Serva)

Fenol (Sigma)

Fenylmethylsulfonyl fluorid - PMSF (Sigma)

Formamid (Serva)

Glukóza (Serva)

Glycerol (Penta)

Glycin (Serva)

Hydroxid sodný (Penta)  
Chlorid draselný (Lachema)  
Chlorid hořečnatý (Lachema)  
Chlorid sodný (Penta)  
Chlorid vápenatý (Sigma)  
Chloroform (Lachema)  
IPTG (Fermentas)  
Izoamylalkohol (Lachema)  
Izopropylalkohol (Penta)  
Kyselina boritá (Serva)  
Kyselina chloristá (Lachema)  
Kyselina chlorovodíková (Lachema)  
Kyselina octová (Lachema)  
Kyselina p-kumarová (Sigma)  
L-glutamin (Sigma)  
Luminol (Serva)  
Methanol (Lachema)  
N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin - TEMED (Sigma)  
Parafinový olej Bayol F (Serva)  
Paraformaldehyd - PFA (Sigma)  
Peroxid vodíku (Sigma)  
Sacharóza (Lachema)  
Salmon sperm DNA (Invitrogen)  
Thiazolyl blue tetrazolium bromide – TBTB (Sigma)  
Tris(hydroxymethyl)aminomethan - TRIS (Serva)  
Triton X-100 (Serva)  
Tween 20 (Fluka)  
Versen (Sevac)  
Želatina z prasečí kůže (Sigma)



### 3.1.3 Buněčné linie

<b>NIH 3T6</b>	stabilní buněčná linie myších fibroblastů, senzitivní a permisivní pro myší polyomavirus (prof. Beverly Griffin, Royal Postgraduate School London)
<b>VERO</b>	opičí buněčná linie odvozená z ledvinné epitelální tkáně afrického kočkodana ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ) (prof. Kristina Dorries, Univerzity Würzburg)
<b>MEF</b>	buněčná linie myších embryonálních fibroblastů (Pier Paolo Pandolfi, Memorial Sloan–Kettering Cancer Center, New York)

### 3.1.4 Viry

<b>Myší polyomavirus, kmen BG</b>	získán od prof. Beverly Griffin, Royal Postgraduate School, London
<b>SV40</b>	získán od prof. Kristiny Dorries, Univerzity Würzburg

### 3.1.5 Bakteriální kmeny

<b><i>Escherichia coli</i> XL1blue</b>	[recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)] (Stratagene)
<b><i>Escherichia coli</i> BL21</b>	tento kmen bakterií kóduje v araB lokusu bakteriofágovou T7 RNA polymerázu, inducibilní exprese T7 RNA polymerázy zajistí vysokou úroveň transkripce z vektoru obsahující T7 promotor (sbírka katedry genetiky a mikrobiologie)

### 3.1.6 Plazmidy

<b>pET29b</b>	expresní vektor plazmidového typu kódující N koncový STag spolu se štěpným místem pro trombin a C koncový HisTag, plazmid dále obsahuje gen pro kanamycinovou rezistenci, fl origin, polylinker, lacI fragment, pBR322 origin, T7 promotor a T7 terminátor (viz Obr. 4.24) (Novagen)
<b>c734A</b>	rekombinantní bakteriální plazmid nesoucí genom viru BK, virový genom byl otevřen v genu pro protein LT a je zaklonován přes restriční místo PstI, plazmid byl použit jako templát v PCR reakci pro přípravu unikátní části proteinu VP2 BKV (Kristina Dorries, Univerzita Würzburg)
<b>pMJG</b>	vektor plazmidového typu odvozený od plazmidu pMJ1, do kterého byl vložen celý genom MPyV linearizovaný enzymem EcoRI (Krauzewicz <i>et al.</i> , 1990)

### 3.1.7 Proteazomální inhibitory

<b>MG-132</b>	carbобензоxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (Z-LLL-CHO), reverzibilní inhibitor proteazómů (Calbiochem)
---------------	---

**Epoxomicin** ireverzibilní inhibitor proteazómů (Calbiochem)

### 3.1.8 Primery pro PCR reakce

**MV\_počátek:** 5' C TAC GA[G↓GATCC]T ATG GGT GCT GCT CTA GC 3'

**MV\_konec:** 5' CGA CTG [C↓TCGAG] GCC TGA TTG CTG ATA GAG 3'

Primery ohraničující unikátní část proteinu VP2 BK viru. Primer MV\_počátek obsahuje štěpící místo pro enzym BamH I (G↓GATCC) a primer MV\_konec skýtá sekvenci rozpoznávanou a štěpenou enzymem Xho I (C↓TCGAG). Sekvence rozpoznávané restriktázami jsou vyznačeny červeně. Podtrženou kurzívou je označena oblast komplementární k amplifikovanému genu. Velikost amplifikovaného fragmentu je 357 bp.

### 3.1.9 Protilátky

#### Primární protilátky

anti CR MPyV – C4:	potkaní monoklonální protilátka proti společné části (common region) všech tří časných T antigenů MPyV - LT, MT, ST, pro imunofluorescenční značení ředěno 1:1, pro průtokovou cytometrii neředěno, funguje na PFA i MetOH fixaci (Dr. S. Dilworth, Imperial College School of Medicine, London)
anti VP1 MPyV – D4:	myší monoklonální protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 MPyV, pro imunofluorescenční značení ředěno 1:1 (A. Morávková, diplomová práce 2001)
anti VP1 MPyV – A3:	myší monoklonální protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 MPyV, pro dot blot neředěno (A. Morávková, diplomová práce 2001)
anti VP1 MPyV:	myší monoklonální protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 MPyV, pro western blot ředěno 1:100 (Forstová <i>et al.</i> 1993)
anti VP1 MPyV – sérum:	králičí sérum proti proteinu VP1 MPyV, použito jako neutralizační sérum proti MPyV v ředění 1:100 (D. Liebl)
anti VP1 SV40:	králičí polyklonální protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 SV40, pro dot blot i imunofluorescenční značení ředěno 1:500 (abcam)
anti 20S proteazóm:	králičí polyklonální protilátka proti 20S proteazómu $\alpha$ a $\beta$ podjednotkám, pro imunofluorescenční značení ředěno 1:1 (abcam)
anti 20S proteazóm:	myší monoklonální protilátka proti 20S proteazómu, pro imunofluorescenční značení ředěno 1:50, nutná MetOH fixace (Santa Cruz Biotechnology)

anti HisTag – Penta-His:	myší monoklonální protilátka proti kotvě HisTag, pro dot blot i western blot ředěno 1:750 (Qiagen)
anti biotin:	králíčí polyklonální protilátka proti biotinu, pro imunofluorescenční značení ředěno 1:100 (Bethyl)

### **Sekundární protilátky**

goat anti mouse – HRP:	kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou, pro dot blot i western blot ředěno 1:1000 (Bio-Rad)
goat anti rabbit – HRP:	kozí protilátka proti králíčím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou, pro dot blot ředěno 1:1000 (Bio-Rad)
donkey anti rat – AF 488:	oslí protilátka proti potkaním imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 488, pro imunofluorescenční značení i průtokovou cytometrii ředěno 1:1000 (Invitrogen)
goat anti rabbit – AF 488:	kozí protilátka proti králíčím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 488, pro imunofluorescenční značení ředěno 1:1000 (Invitrogen)
goat anti rabbit – AF 546:	kozí protilátka proti králíčím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 546, pro imunofluorescenční značení ředěno 1:1000 (Invitrogen)
donkey anti mouse – AF 488:	oslí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 488, pro imunofluorescenční značení ředěno 1:1000 (Invitrogen)
donkey anti mouse – AF 546:	oslí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 546, pro imunofluorescenční značení ředěno 1:1000 (Invitrogen)

### **3.1.10 Fluorescenční barviva a fluorogenní substráty**

<b>Substrát III</b>	suc-LLVY-AMC, fluorogenní substrát pro měření chymotrypsinové aktivity (Calbiochem)
<b>Substrát VI</b>	Z-ARR-AMC, fluorogenní substrát pro měření trypsinové aktivity (Calbiochem)
<b>Propidium iodid</b>	(Calbiochem)
<b>Ethidium bromid</b>	(Calbiochem)
<b>DAPI (4,6-diamidino-2-fenyldiol dihydrochlorid)</b>	(Sigma)

### 3.1.11 Enzymy

- ✓ restrikční endonukleázy: BamH I, Xho I (Fermentas)
- ✓ T4 DNA ligáza (Fermentas)
- ✓ DNA polymeráza Vent (New England BioLabs)
- ✓ Alkalická fosfatáza FastAP<sup>TM</sup> (Fermentas)

Výše uvedené enzymy byly používány pouze s komerčními pufrý doporučenými a dodávanými výrobcem.

- ✓ RNáza A (Fermentas)
- ✓ DNáza (Sigma)
- ✓ Trypsin (Lonza)
- ✓ Proteináza K (Fermentas)
- ✓ Lysozym (Serva)
- ✓ Neuraminidáza (Sigma)

### 3.1.12 Složení nejčastěji používaných roztoků

- ✓ **PBS** (Phosphate Buffered Saline): 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4
- ✓ **pufr B**: 10 mM Tris-HCl (pH=7,4), 150 mM NaCl, 0,01 mM CaCl<sub>2</sub>
- ✓ **pufr TE**: 10 mM Tris-HCl (pH=8), 1 mM EDTA-NaOH (pH=8)
- ✓ **SSC pufr 20x**: 3 M NaCl, 300 mM sodium citrát (pH=7)
- ✓ **pufr TBE 0,5x**: 45 mM Tris-HCl (pH=8,0), 1 mM EDTA-NaOH (pH=8,0), 45 mM kyselina boritá

### 3.1.13 Kultivační média

#### Média pro tkáňové kultury

- ✓ **DMEM médium s 10% sérem** (používané pro buňky 3T6, MEF): DMEM (Dublecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma), 10% fetální bovinní sérum (Sigma), 2 mM L-glutamin (Gibco), směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma)
- ✓ **DMEM médium s 5% sérem** (používané pro buňky Vero): DMEM (Dublecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma), 5% fetální bovinní sérum (Sigma), 2 mM L-glutamin (Gibco), směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma)
- ✓ **DMEM médium bez séra** (používané pro buňky 3T6, MEF a Vero): DMEM (Dublecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma), 2 mM L-glutamin (Gibco), směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma)
- ✓ **DMEM médium bez fenolové červeně** (používané pro měření proteolytické aktivity ve virovém inokulu) (Sigma)

### Bakteriální média

- ✓ **SOC médium:** 2% (w/v) pepton pro bakteriologii, 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát, 20 mM glukóza, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>
- ✓ **TPN médium:** 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát, 2% (w/v) pepton pro bakteriologii, 0,5% (w/v) NaCl
- ✓ **živný bujón č. 2:** 2% živný bujón č. 2 (Imuna)
- ✓ **živný agar č. 2:** 4% živný agar č. 2 (Imuna)

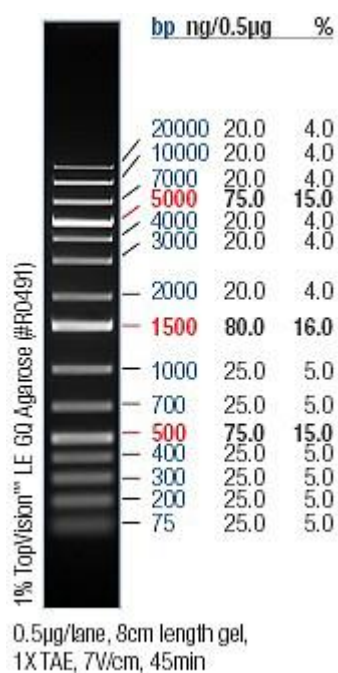
### 3.1.14 Antibiotika

- ✓ **směs antibiotik pro tkáňové kultury:** používaný 100x koncentrovaný roztok obsahuje na 1 ml 10000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu a 25 mg amphotericinu B (Sigma)
- ✓ **kanamycin:** konečná koncentrace 50µg/ml (Sigma)

### 3.1.15 Markery molekulových hmotností

#### DNA marker

O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

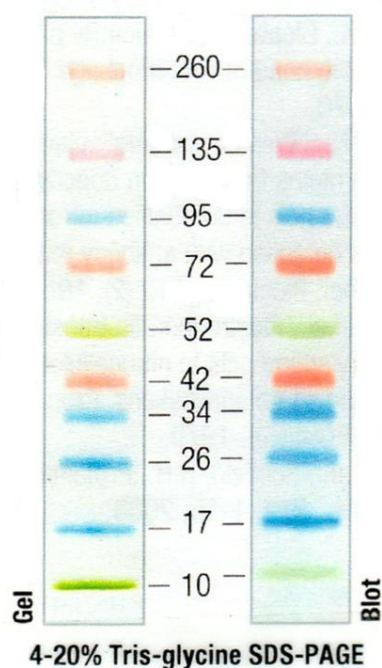


**Obr. 3.1:** Velikost DNA fragmentů v párech bazí a jejich množství u markeru O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder pro agarózovou DNA elektroforézu.

### **SDS-PAGE marker**

Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas)

Lot specific calculated apparent MW, kDa



**Obr. 3.2: Velikosti proteinů v kDa u markeru Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder pro SDS-PAGE.**

#### **3.1.16 Komerční soupravy**

- ✓ BioNick™ Labeling System – příprava DNA sondy pro FISH (Invitrogen)
- ✓ NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) – izolace DNA z agarózového gelu
- ✓ QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) – izolace plazmidové DNA
- ✓ HisTrap FF crude – izolace proteinu s kotvou HisTag (GE Healthcare)

## 3.2 METODY

### 3.2.1 Práce s tkáňovými kulturami

Savčí buňky byly kultivovány v termostatu při 37°C v 5% atmosféře CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.1.1. Pasážování myších buněk 3T6, MEF a opičích Vero buněk

Z Petriho misky s konfluentně narostlými buňkami bylo odsáto médium. Buňky byly opláchnuty roztokem verzenu (3 ml na misku o Ø 6 cm), který byl krátce poté odsát. Následně byl k buňkám přidán roztok trypsinu (500µl na misku o Ø 6 cm) a Petriho miska s buňkami byla inkubována v termostatu, dokud se buňky neoddělily od povrchu misky, max. však 10 min. Poté byl trypsin inaktivován přidáním sérového média a buňky byly důkladně resuspendovány několikanásobným protažením pipetou. Pro některé účely byly buňky následně počítány v Bürkerově komůrce (kapitola 3.2.1.2.) a byl tak vyséván definovaný počet buněk na Petriho misky o Ø 10, 6 nebo 4 cm či na mikroskopická sklíčka o Ø 12 mm ve 24 jamkové destičce. Pro jiné účely byly buňky pasážovány v určitém poměru (konkrétně uvedeno u jednotlivých metod). Poté byl objem doplněn sérovým DMEM médiem do 10 ml u misek o průměru 10 cm, do 5 ml u misek s Ø 6 cm, do 3 ml u misek s Ø 4 cm a do 1 ml v případě 24 jamkové destičky.

#### Použité roztoky:

**roztok verzenu:** 0,25% verzen v PBS

**roztok trypsinu:** 0,25% trypsin v PBS

**DMEM médium s 10% (3T6, MEF) a 5% (Vero) sérem**

#### 3.2.1.2. Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Buňky byly pomocí trypsinu odchyceny z povrchu Petriho misky a resuspendovány v sérovém DMEM médiu. Cca 20µl buněčné suspenze bylo vpraveno pod sklíčko do Bürkerovy komůrky. Následně byl spočítán počet buněk v 16 nejmenších čtvercích. Čtverce byly počítány diagonálně. Průměrný počet buněk na jeden čtverec byl vynásoben koeficientem  $2,5 \times 10^5$ . Výsledek byl počet buněk vyskytující se v 1 ml.

#### Použité roztoky:

**roztok verzenu:** 0,25% verzen v PBS

**roztok trypsinu:** 0,25% trypsin v PBS

**DMEM médium s 10% (3T6, MEF) a 5% (Vero) sérem**

### **3.2.1.3 Synchronizace savčích buněk**

Buňky narostlé do konfluence 30-40% byly za účelem synchronizace do G0 fáze buněčného cyklu kultivovány 24 hodin v bezsérovém DMEM médiu.

Použité roztoky:

**DMEM médium bez séra**

### **3.2.1.4 Standardní infekce buněk 3T6 a MEF MPyV a buněk Vero virem SV40**

Virové inokulum bylo 3x 30s sonikováno ve stolním sonikátoru a mezitím chlazeno min. 30s na ledu. Od buněk narostlých do 50 – 70% konfluence bylo odsáto sérové médium a buňky byly opláchnuty DMEM médiem bez séra. Požadované množství virového inokula bylo smícháno s minimálním objemem DMEM média bez séra a aplikováno na buňky (v případě misek o Ø 10 cm byl přidán 1 ml média s virovým inokulem, u misek s Ø 6 cm 0,5 ml média s virovým inokulem, u misek s Ø 4 cm 0,4 ml média s vir. inokulem a v případě 24 jamkové destičky bylo aplikováno 0,2 ml média s vir. inokulem). Buňky byly takto inkubovány 1 - 1,5 hod v termostatu a každých cca 10 minut bylo s miskami kýváno. Po uplynutí této doby bylo k buňkám přidáno DMEM médium se sérem vytemperované na 37°C. Čas infekce byl počítán od doby přidání viru.

Použité roztoky:

**DMEM médium bez séra**

**DMEM médium s 10% (3T6, MEF) a 5% (Vero) sérem  
virové inokulum**

### **3.2.1.5 Synchronizovaná infekce buněk 3T6 MPyV a buněk Vero virem SV40**

Virové inokulum bylo 3x 30s sonikováno ve stolním sonikátoru a mezitím chlazeno min. 30s na ledu. Synchronizované buňky narostlé do 50 – 70% konfluence byly inkubovány 10 min na ledu. Po odsátí média bez séra bylo k buňkám přidáno naředěné studené virové inokulum v DMEM médiu bez séra (množství média s virovým inokulem viz kapitola 3.2.1.4) a buňky byly takto inkubovány 30 – 40 min na ledu za stálého kývání. Při těchto podmínkách se virové částice naváží na buněčné receptory, ale nevstupují do buněk. Po uplynutí inkubační doby bylo studené médium s virovým inokulem odsáto a bylo přidáno DMEM médium se sérem vytemperované na 37°C a buňky byly vloženy do termostatu. Tento krok spustil internalizaci virových částic buňkou a od této doby byl tedy počítán čas infekce.



Použité roztoky:

**DMEM médium bez séra**

**DMEM médium s 10% (3T6) a 5% (Vero) sérem**

**virové inokulum**

### **3.2.1.6 Fixace savčích buněk pro účely imunofluorescence**

Od buněk narostlých na mikroskopických sklíčkách v 24 jamkové destičce bylo opatrně po straně jamky odsáto médium. Buňky byly opláchnuty roztokem PBS pro tkáňové kultury. Pro některé protilátky bylo nutné použít methanolovou fixaci (myší protilátka proti 20S proteazómu). Buňky byly opůsobeny ledově vychlazeným methanolem, který byl po 5 min (ne více) odsát. Methanol buňky zároveň fixuje i permeabilizuje. Po oschnutí mohly být buňky takto skladovány při -20°C. V některých případech bylo přistoupeno k fixaci paraformaldehydem. K buňkám byl přidán 4% PFA po dobu 15 min nebo 3% PFA po dobu 25 min. Po odsátí PFA byly buňky permeabilizovány 0,5% Tritonem X-100 po dobu 5 min. Následně byly buňky promyty PBS 3x 10 min.

Použité roztoky:

**1x PBS pro tkáňové kultury**

**ledově vychlazený MetOH**

**3 nebo 4% PFA v PBS**

**0,5% Triton X-100 v PBS**

### **3.2.1.7 Nepřímé imunofluorescenční značení**

Zafixované, permeabilizované a opláchnuté buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách byly vysyceny blokačním roztokem po dobu 1 hod (možno i přes noc při 4°C). Po odsátí blokačního roztoku byly buňky inkubovány s primární protilátkou ředěnou v blokačním roztoku po dobu 1 hod (možno i přes noc při 4°C). Následně byly buňky promyty PBS 3x 10 min. Poté byla k buňkám přidána sekundární protilátka ředěná v blokačním roztoku a buňky byly takto inkubovány 30 min ve tmě. Následovalo promytí buněk PBS 3x 10 min. Sklíčko s buňkami bylo namočeno do destilované vody, čímž byl vzorek zbaven solí z PBS. Po uschnutí bylo sklíčko montováno do kapky 50% glycerolu s DAPI pro zviditelnění jader.

Použité roztoky:

**blokační roztok:** 0,25% želatiny a 0,25% BSA v PBS

**montovací roztok:** 50% glycerol s DAPI o koncentraci 0,1 µg/ml

**1x PBS pro TK**

### **3.2.2 Izolace myšího polyomaviru a viru SV40**

Buňky 3T6 byly pasážovány poměrem 1:10 na 20 misek o průměru 10 cm. Do některých misek bylo předem vloženo sterilní mikroskopické sklíčko o Ø 12 mm. K infekci MPyV bylo přistoupeno, když buňky dosáhly 30% konfluence. Buňky byly infikovány s nízkou multiplicitou infekce, MOI=0,1. 2 dny a 6 dní po infekci byla sklíčka z misek s infikovanými buňkami vyndána a buňky byly značeny na přítomnost LT antigenu nepřímou imunofluorescencí (kapitola 3.2.1.7) pro kontrolu průběhu infekce. V průběhu šíření infekce bylo DMEM médium se sérem vyměněno za čerstvé. Odebrané médium bylo zamraženo při -20°C a schováno tak na pozdější izolaci viru. Buňky Vero byly pasážovány v poměru 1:10 na 20 misek o průměru 10 cm. Infikované Vero buňky byly v průběhu pomnožování viru zpasažovány v poměru 1:5 celkově na 15 misek s cílem lepšího šíření viru. Další procedury izolace viru byly stejné jak u MPyV, tak u viru SV40. Po devíti dnech infekce byly buňky 3x zmrazeny v -80°C a rozmrazeny a následně seškrábány a centrifugovány společně s médiem odebraným v průběhu infekce (40 min., 4150g, 4°C). Supernatant byl uschován při 4°C a pelet byl po rozpuštění v 10mM roztoku Tris-HCl (pH=7,4) homogenizován ručním skleněným homogenizátorem na ledu 8x 10 protažení pístem. K homogenátu byl přidán inhibitor proteáz aprotitin a neuraminidáza a směs byla inkubována při laboratorní teplotě přes noc za stálého kývání. Další den byl homogenát centrifugován (40 min., 4150g, 4°C) a supernatant byl spojen s předcházejícím a uschován při 4°C. Pelet byl resuspendován ve 3 ml 10mM Tris-HCl (pH=9) a inkubován při laboratorní teplotě 4 hod za stálého kývání. Poté byla směs centrifugována (40 min., 4150g, 4°C). Supernatant byl opět spojen s předcházejícími a pelet byl vyhozený.

Použité roztoky:

**DMEM médium s 10% (3T6) a 5% (Vero) sérem**

**10mM Tris-HCl (pH=7,4)**

**10mM Tris-HCl (pH=9)**

**Aprotitin (2µg/ml)**

**Neuraminidáza (0,01U/ml)**

### **3.2.2.1 Centrifugace přes sacharózový polštář**

Médium obsahující virus (spojené supernatanty z předcházejících kroků) bylo zahuštěno a přečištěno centrifugací přes vrstvu 10% sacharózy. Médium s virem bylo rozděleno do ultracentrifugačních zkumavek a podvrstveno 2 – 3 ml 10% sacharózy. Takto připravený virus byl centrifugován na ultracentrifuze Beckman 3 hod při 25 000 rpm na rotoru SW 28. Pelet byl přes noc rozplavován při 4°C v B pufru. Další den byl virus v B pufru homogenizován ve skleněném homogenizátoru na ledu 8x 10 protažení pístem.

#### Použité roztoky:

#### **10% sacharóza v B pufru**

#### **B pufr**

### **3.2.2.2 Izopyknická centrifugace v rovnovážném CsCl gradientu**

Díky centrifugaci v CsCl gradientu můžeme oddělit viriony obsahující virovou DNA a prázdné virové částice bez virové DNA na základě jejich rozdílné vznášivé hustoty. Virus v B pufru získaný v předchozím kroku (po centrifugaci přes sacharózový polštář) byl rozdělen do centrifugačních zkumavek a smíchán s CsCl tak, aby výsledná hustota vzorku byla 1,3g/ml (ideální je poměr 7,9g virové suspenze v B pufru a 3,79g CsCl, tedy poměr 2,5:1,2). Výsledná hustota roztoku 1,3g/ml byla ověřena změřením refraktometrického indexu roztoku, hodnota by měla být v rozmezí 1,363 – 1,366. Roztok s MPyV byl rozdělen do čtyř CsCl gradientů a roztok s virem SV40 do tří gradientů. Směs v ultracentrifugačních zkumavkách byla převrstvena parafínovým olejem a po vyvážení kyvet centrifugována na ultracentrifuze Beckman 20 hod při 35 000 rpm a 18°C na rotoru SW 41. Vzniklý gradient byl rozdělen pomocí peristaltické pumpy na 17 – 20 frakcí po 300 – 400 µl. U všech frakcí byl změřen refraktometrický index a detekován protein VP1 metodou dot blot (kapitola 3.2.9.5). Na základě těchto dvou metod byly spojeny frakce obsahující plné viriony (refraktometrický index=1,365 - 1,366), prázdné virové částice (refraktometrický index=1,362 - 1,363) a zbytkové frakce kromě frakcí jednoznačně neobsahujících virus. Takto spojené frakce byly dialyzovány.

#### Použité roztoky:

#### **CsCl**

#### **B pufr**

#### **Parafínový olej**

### 3.2.2.3 Dialýza

Během dialýzy dochází k přechodu nízkomolekulárních látek (např. CsCl) přes polopropustnou membránu z prostředí o vyšší koncentraci roztoku do prostředí s nižší koncentrací. Jako polopropustná membrána byla použita dialyzační membrána a tímto způsobem byla virová suspenze zbavena CsCl, zatímco virové částice (tedy vysokomolekulární látky jako jsou proteiny a DNA) zůstaly uvnitř membrány. Dialyzační membrána byla 10 min vařena v destilované vodě a následně naplněna spojenými frakcemi obsahujícími virovou suspenzi a opatřena dialyzačními svorkami. Dialýza probíhala ve 2 l vychlazeného pufru B při 4°C za stálého míchání nejprve 1 hodinu, poté byl B pufr vyměněn za čerstvý a dialýza pokračovala přes noc. Po dialýze byla virová suspenze zahuštěná centrifugací přes 10% sacharózový polštář (kapitola 3.2.2.1) a následně homogenizována v B pufru.

Použité roztoky:

#### **B pufr**

### 3.2.2.4 Hemaglutinační test

Díky hemaglutinačnímu testu jsme schopni určit celkový počet virových částic (infekčních i neinfekčních), tedy tzv. hemaglutinační titr viru (jednotky HAU, haemagglutination units). Tento test je založen na schopnosti proteinu VP1 tzv. aglutinovat červené krvinky díky interakci kapsidového proteinu VP1 s kyselinou sialovou přítomnou na povrchu morčecích erytrocytů. Aglutinované krvinky vytvoří v jamce s kulatým dnem síť, a tedy nesedimentují, zatímco neaglutinované krvinky sedimentují na dno jamky a my můžeme pozorovat na dně jamky červenou tečku. Tuto schopnost má protein VP1 MPyV, ale ne protein VP1 viru SV40. Tento test byl tedy proveden pouze s MPyV. Míra aglutinace je dána množstvím virových částic v suspenzi. Počet hemaglutinačních jednotek HAU tedy odpovídá nejvyššímu ředění viru, které ještě aglutinuje červené krvinky. Morčecí krev byla centrifugována v centrifuze Beckman Centrifuge GS-15R (20 min, 2600 rpm, 4°C) a třikrát promytá roztokem 0,2% BSA v PBS. Koncentrace erytrocytů byla stanovena pomocí hematokritu. Bylo nanášeno 30 µl promíchané suspenze krvinek do heparinizované kapiláry, která byla na jednom konci zatavena a centrifugována na centrifuze MPW 300 s rotorem pro hematokrit CM-304 (2500 rpm, 5 min). Hematokrit byl stanoven jako procentuální poměr výšky celého sloupce tekutiny v kapiláře k výšce sloupce erytrocytů. Roztok erytrocytů byl naředěn roztokem 0,2% BSA v PBS na koncentraci erytrocytů 0,4%.

Do všech jamek tvaru U mikrotitrační destičky bylo nanášeno 50  $\mu$ l 0,2% BSA v PBS. Byla vytvořena sestupná ředící řada virové suspenze tak, že do prvního sloupce destičky bylo nanášeno 50  $\mu$ l naředěné virové suspenze (5  $\mu$ l virového inokula + 45  $\mu$ l 0,2% BSA v PBS), ze které bylo po důkladném promíchání přeneseno 50  $\mu$ l směsi do následující jamky a tento postup byl opakován až do poslední jamky ředící řady. Nakonec bylo do všech jamek přidáno 50  $\mu$ l 0,4% suspenze erytrocytů a destička byla uložena přes noc při 4°C. Hemaglutinační titr byl následující den (nejdříve však po 6 hod) odečten podle vzorce  $HAU = \text{ředění viru} \times 2^n$ , kde n je pořadí jamky s nejvyšším ředěním virového inokula, které ještě aglutinovalo červené krvinky. 1 HAU pro MPyV odpovídá  $1 \times 10^7$  virových částic na ml.

Použité roztoky:

**0,2% BSA v PBS**

### **3.2.2.5 Určení infekčního titru viru pomocí imunofluorescence**

Virus byl sonikován a naředěn 100x ( $10^{-2}$ ), 1000x ( $10^{-3}$ ), 10 000x ( $10^{-4}$ ) a 100 000x ( $10^{-5}$ ) do DMEM média bez séra. Buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách byly infikovány takto naředěným virovým inokulem (kapitola 3.2.1.4). Buňky byly zafixovány 24 hpi v případě MPyV a 40 hpi v případě viru SV40 a byl značen protein LT metodou nepřímé imunofluorescence (kapitoly 3.2.1.6 a 3.2.1.7). Následně byl spočítán pod fluorescenčním mikroskopem počet infikovaných buněk a podle vzorce byl spočítán titr viru. Standardní vzorec pro výpočet titru viru pomocí imunofluorescence: *průměrný počet LT pozitivních buněk na pole  $\times$  faktor zvětšení mikroskopu* (pro zvětšení 20x je faktor 211, pro zvětšení 40x je faktor 844)  *$\times$  faktor ředění* (např. při ředění 1000x, tedy  $10^{-3}$  je faktor ředění  $10^3$ )  *$\times$  faktor 1 ml* (pokud jsme na 1 sklíčko dávali např. 200  $\mu$ l ředěného virového inokula, pak faktor 1 ml je 5). Výsledkem je počet infekčních virových částic na ml.

Použité roztoky:

**DMEM médium bez séra**

**DMEM médium s 10% (3T6, MEF) a 5% (Vero) sérem**

### **3.2.2.6 Určení infekčního titru viru pomocí průtokové cytometrie**

Na Petriho misku a průměru 6 cm bylo vyseto definované množství buněk, v případě buněk 3T6  $1 \times 10^6$  a v případě MEF buněk  $1,5 \times 10^6$ . V případě srovnávání titru viru získaného metodou průtokové cytometrie a metodou nepřímé imunofluorescence bylo do každé misky přidáno před pasáží mikroskopické sklíčko o průměru 12mm.

Další den byly buňky infikovány definovaným množstvím viru naředěným v DMEM médiu bez séra (kapitola 3.2.1.4) a paralelně byla jedna miska využita ke spočítání počtu buněk v čase infekce, které je zapotřebí znát pro určení infekčního titru viru s použitím níže uvedeného vzorce. Po 24 hpi byla sklíčka přendána do destičky, zafixována a značena metodou nepřímé imunofluorescence (kapitoly 3.2.1.6 a 3.2.1.7). Infikované buňky na Petriho miskách byly zpracovány pro měření na průtokovém cytometru (kapitola 3.2.3.1 a 3.2.3.2). Následně byl určen infekční titr viru pomocí vzorce:

$$\frac{\% \text{ LT pozitivních buněk} \times \text{počet buněk, které byly infikovány}}{\text{ml infikujícího viru}}$$

*ml infikujícího viru*

Použité roztoky:

**DMEM médium bez séra**

**DMEM médium s 10% (3T6) a 5% (Vero) sérem**

### **3.2.2.7 Určení infekčního titru viru pomocí plakové zkoušky**

Buňky MEF byly vysety na 6 jamkovou destičku (průměr jamky 4 cm) v množství  $8 \times 10^5$  buněk na misku. Druhý den byly buňky infikovány virovým inokulem v ředění  $10^{-4}$  až  $10^{-7}$  (0,4 ml DMEM média bez séra + 0,1 ml naředěného viru na misku). Po 90 minutové inkubaci v termostatu za občasného kývání bylo médium odsáto a k buňkám bylo přidáno 2,5 ml na misku lehce zchladlého (40°C) zalévacího média. Misky byly inkubovány 20 minut mimo termostat za účelem zatuhnutí zalévacího média. Poté byly buňky inkubovány v termostatu 6 – 9 dní (v igelitu a s namočenou buničitou vatou, aby nedošlo k vyschnutí a popraskání agarózy). Plaky byly po jejich vyvinutí obarveny barvivem TBTB (0,1 objemu) a po inkubaci 3 hod v termostatu bylo množství plaků spočítáno. Infekční titr viru byl spočítán podle vzorce: *průměrný počet plaků vyskytující se na misce při určitém ředění x faktor ředění* (např. při ředění  $10^{-5}$  je faktor ředění  $10^5$ ) *x faktor 1 ml* (v tomto případě 10, protože buňky byly infikovány 0,1ml virového inokula). Výsledkem je počet infekčních částic na ml v jednotkách pfu (plaque forming units).

Použité roztoky:

**zalévací médium:** 0,8% SeaPlaque agaróza  
DMEM médium bez séra  
1x směs antibiotik pro tkáňové kultury  
7,5% fetální bovinní sérum  
0,5% DMSO

**TBTB - thiazolyl blue tetrazolium bromide 5 mg/ml**

### **3.2.2.8 Elektronová mikroskopie**

Všechny elektronmikroskopické pokusy uvedené v této diplomové práci byly provedeny Mgr. Vojtěchem Žilou, Mgr. Martinem Fraiberkem a RNDr. Jitkou Štokrovou CSc.

#### **3.2.2.8.1 Negativní barvení**

Na 5 µl kapku vzorku byla položena Cu síťka s parlodionovou pouhlikovanou membránou. Vzorek byl adsorbován 5 – 10 min. Síťka byla následně promyta na 100 µl kapkách ddH<sub>2</sub>O 2x 30 sec a poté byla obarvena na 100 µl kapce roztoku 2% kyseliny fosfowolframové 2x 1 minutu. Barvivo bylo opatrně odsáto filtračním papírem a síťka byla nechána zaschnout 30 min při pokojové teplotě.

Použité roztoky:

**2% kyselina fosfowolframová**

### **3.2.3 Průtoková cytometrie**

#### **3.2.3.1 Příprava a fixace buněk pro účely fluorescenční průtokové cytometrie**

Od buněk 3T6 narostlých na Petriho miskách o průměru 6 nebo 4 cm bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty roztokem verzenu a po odsátí byl přidán trypsin. Po uvolnění buněk z podkladu byl účinek trypsinu zastaven DMEM médiem s 10% sérem. Buňky byly v médiu dobře resuspendovány a přepipetovány do 15 ml zkumavek. Od této doby byly buňky drženy na ledu. Buňky byly stočeny na centrifuze s výkyvným rotorem (10 min, 405 g, 4°C), médium bylo následně odsáto a buňky propláchnuty 3 ml PBS. Poté byly buňky opět centrifugovány (10 min, 405 g, 4°C), PBS bylo odsáto a pelet byl důkladně resuspendován ve 300 µl PBS.

K buňkám v PBS bylo přidáno 800 µl ledově vychlazeného 96% ethanolu (finální koncentrace EtOH 70%) po kapkách za stálého jemného vortexování, aby bylo zabráněno shlukování buněk. Buňky byly poté inkubovány 30 min na ledu nebo je možno buňky v EtOH skladovat při -20°C až několik týdnů. Pro další použití je nutné buňky v EtOH stočit (405 g, 10 min, 4°C) a propláchnout v PBS.

Použité roztoky:

**roztok verzenu:** 0,25% verzen v PBS

**roztok trypsinu:** 0,25% trypsin v PBS

**DMEM médium s 10% sérem**

**ledově chlazený 96% EtOH**

**1x PBS pro tkáňové kultury**

### **3.2.3.2 Fluorescenční značení vnitrobuněčných antigenů pro měření na průtokovém cytometru**

Všechny kroky probíhaly na ledu. Zafixované a propláchnuté buňky byly inkubovány s blokačním roztokem min. 30 min. Po stočení (10 min, 405 g, 4°C) a odsátí blokačního roztoku byl buněčný pelet resuspendován ve 300 µl primární protilátky a inkubován min. 30 min. Poté byl pelet 2 – 3x promyt 3 ml PBS pomocí centrifugace (10 min, 405 g, 4°C) a následného odsávání. Poté byl buněčný pelet resuspendován ve 300 µl roztoku sekundární protilátky a inkubován 30 min (ne déle) ve tmě. Po skončení inkubační doby byly buňky opět 2 - 3x propláchnuty 3 ml PBS. Na závěr byl pelet resuspendován ve 200 – 1000 µl PBS (podle velikosti peletu) a buňky byly přeneseny do speciální zkumavky a měřeny průtokovým cytometrem.

Použité roztoky:

**blokační roztok:** 0,2 % želatina a 5% FBS v PBS

**1x PBS pro tkáňové kultury**

### **3.2.3.3 Značení buněk propidium iodidem**

Pro účely rozlišení mrtvých buněk v suspenzi nebyly buňky před označením propidium iodidem fixovány. Buňky byly pouze opláchnuty od média pomocí PBS a pelet byl resuspendován v cca 500 µl roztoku PI. Pro účely značení DNA byly buňky fixovány (kapitola 3.2.3.1) a promytý pelet byl resuspendován v cca 500 µl roztoku PI. Buňky v roztoku PI byly inkubovány 30 – 40 min při 37°C ve tmě.



Poté byl tento roztok s buňkami přenesen do speciální zkumavky a buňky byly měřeny průtokovým cytometrem.

#### Použité roztoky:

**roztok PI:** 25 µg /ml propidium iodidu v PBS (+ 1 mg/ml RNázy A v případě značení DNA)

### **3.2.4 Pokusy s proteazomálními inhibitory**

Myší fibroblasty 3T6 pokrývající 30 – 40% povrchu misky či sklíčka byly synchronizovány 24 hodinovou inkubací v DMEM médiu bez séra (kapitola 3.2.1.3). Následující den po 24 hodinách bylo médium z buněk odsáto a v různých časech před infekcí byl přidán inhibitor proteazómů MG-132 ředěný v DMEM médiu bez séra (finální koncentrace 2 nebo 20 µM) či epoxomicin ředěný v DMEM médiu bez séra (finální koncentrace 5 µM). Do kontrol bez inhibitorů bylo vždy přidáno DMSO ve stejném množství jako pro inhibitory, protože oba proteazomální inhibitory jsou v DMSO rozpustné. Buňky byly uloženy do termostatu. Po uplynutí příslušné doby byla provedena synchronizovaná infekce buněk na ledu (kapitola 3.2.1.5), přičemž virus byl ředěn do DMEM média bez séra s příslušným množstvím inhibitoru proteazómů. Čas infekce, tedy čas 0, byl okamžik přidání teplého DMEM média se sérem k buňkám s naadsorbovaným virem následující po odsátí naředěného virového inokula od buněk. V tomto kroku byl v DMEM médiu se sérem přítomen také inhibitor proteazómů v příslušné koncentraci. V některých pokusech byl MG-132 přidán až po infekci buněk. V tom případě bylo stávající médium odsáto a k buňkám bylo přidáno DMEM médium se sérem spolu s proteazomálním inhibitorem. Buňky byly inkubovány při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> do doby, než došlo k odmytí inhibitoru. Proteazomální inhibitor byl odmyt v požadovaný čas. Médium s inhibitorem bylo od buněk odsáto a následně byly buňky 3x promyty DMEM médiem. Poté byly buňky inkubovány s neutralizačním sérem 30 min v termostatu, aby došlo k vytitrování viru, který nevstoupil do buněk. Po odsátí neutralizačního séra bylo k buňkám přidáno čisté DMEM médium se sérem a buňky byly uloženy v termostatu při 37°C a 5% CO<sub>2</sub> do doby fixace buněk, obvykle 24 hpi. S buňkami bylo dále nakládáno tak, aby mohly být analyzovány průtokovým cytometrem (kapitola 3.2.3) nebo metodou FISH (kapitola 3.2.6.2).

Použité roztoky:

**DMSO**

**MG-132** (zásobní roztok 10mM)

**Epoxomicin** (zásobní roztok 1mM)

**DMEM médium s 10% sérem**

**DMEM médium bez séra**

**neutralizační sérum:** králičí sérum proti proteinu VP1 MPyV, ředěno 1:100 do DMEM médium bez séra

### **3.2.5 Vyloučení proteolytické aktivity přítomné v používaném virovém inokulu pomocí fluorescenční spektroskopie**

K detekci chymotrypsinové aktivity byl použit fluorogenní substrát III, ke stanovení trypsinové aktivity substrát VI. Tyto fluorogenní substráty jsou krátké peptidy, jejichž C terminální aminokyselina je konjugovaná s flouroforem. V přítomnosti příslušné proteolytické aktivity jsou substráty štěpeny za touto C terminální aminokyselinou a současně dochází k uvolnění fluoroforu. Pro měření byla použita černá 96 jamková destička. Celkový objem směsi v jedné jamce byl 50 nebo 70  $\mu$ l, ale v jednom pokusu vždy stejně. Příprava směsi v jamkách probíhala na ledu. Nejprve bylo smícháno DMEM médium bez fenolové červeně s fluorogenním substrátem (konečná koncentrace substrátů byla 25  $\mu$ M), příslušné množství bylo pipetováno do jamek, následně byly přidány 2 nebo 3  $\mu$ l virového inokula. Bylo dbáno na to, aby v každé jamce byl stejný objem a stejné množství DMSO za účelem dosažení stejného menisku tekutiny v jamkách a tím pádem minimalizace chyb měření. Po smíchání všech složek směsi byla destička inkubována 20 min při 37°C. Následně byla fluorescence měřena na spektrofluorometru při excitačním maximu 360 nm v rozsahu emisních vlnových délek odpovídajících 395 - 500 nm. Při obou měřeních byl použit filtr absorbující emisní vlnové délky v rozsahu cca 360 - 400 nm. Měření na fluorescenčním spektrometru provedl RNDr. Radovan Fišer, Ph.D.

Použité roztoky:

**DMEM médium bez fenolové červeně**

**proteazomální fluorogenní substrát III** (rozpuštěn v DMSO, zásobní roztok 10mM)

**proteazomální fluorogenní substrát VI** (rozpuštěn v DMSO, zásobní roztok 10mM)

**DMSO**

**MG-132** (zásobní roztok 10mM)

### 3.2.6 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

#### 3.2.6.1 Příprava DNA sondy na fluorescenční *in situ* hybridizaci

Biotinylovaná DNA sonda pro účely fluorescenční *in situ* hybridizace byla připravena z plazmidu pMJG a byla tedy namířena proti genomu MPyV. K přípravě biotinylované sondy byl použit kit BioNick<sup>TM</sup> Labeling System (Invitrogen). Nejprve byla na ledu připravena reakční směs: 1,5 µg plazmidu pMJG, 5 µl 10x dNTP Mixu, 5 µl 10x Enzyme mixu, doplněno destilovanou vodou do celkového objemu 50 µl. Po důkladném promíchání směsi na vortexu a krátkém stočení byla směs inkubována 1 hod při 16°C. Následně bylo ke směsi přidáno 5 µl Stop pufru. Část této směsi (5µl) byla analyzována pomocí agarózové elektroforézy (kapitola 3.2.8.1). K 50 µl DNA směsi bylo přidáno 50 µl 50% dextran sulfátu (konečná koncentrace 10%), 25 µl 20x SSC pufru (konečná koncentrace 2x), 125 µl deionizovaného formamidu (konečná koncentrace 50%) a salmon sperm DNA (konečná koncentrace 10 ng/µl). Takto připravená DNA sonda byla skladována při -20°C.

#### Použité roztoky:

**dNTP Mix 10x, Enzyme mix 10x, destilovaná voda, Stop pufr** (součást kitu BioNick<sup>TM</sup> Labeling System - Invitrogen)

**50% dextran sulfát** (konečná koncentrace 10%)

**20x SSC pufr** (konečná koncentrace 2x)

**deionizovaný formamid** (konečná koncentrace 50%)

**salmon sperm DNA** (konečná koncentrace 10 ng/µl)

#### 3.2.6.2 Vlastní fluorescenční *in situ* hybridizace

Od buněk narostlých na mikroskopických sklíčkách bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty PBS. Následně byly buňky fixovány 20 – 30 min v -20°C ledově vychlazenou směsí methanolu a kyseliny octové v poměru 3:1. Po této inkubaci je možno sklíčka s buňkami nasucho krátkodobě uskladnit v -20°C (delší skladování není vhodné). Buňky byly po fixaci 3x opláchnuty PBS a poté ošetřeny RNázou (konečná koncentrace 100 µg/ml) po dobu 1 hod v 37°C. Po proplachu v PBS (2x) došlo k dehydrataci sklíček s buňkami vzestupnou koncentrační řadou ethanolu. Byl použit ledově vychlazený ethanol 50%, 70%, 80% a nakonec 96%. Buňky byly v ethanolu vždy ponechány 2 min. Po dehydrataci je možno suchá sklíčka krátkodobě uskladnit v -20°C.

Na podložní sklo bylo nanášeno 10  $\mu$ l (60 ng) DNA sondy a na tuto kapku bylo položeno krycí sklíčko s buňkami. Takto připravené podložní sklo bylo vloženo do PCR cykléru a byl zvolen program obsahující: 90 °C 2 min, 80 °C 2 min, 70 °C 2 min, 60 °C 2 min, 50 °C 2 min. Mezitím bylo do hybridizační komůrky vytemperované na 37°C kápnuto po stranách 6  $\mu$ l 2x SSC pufru. Po skončení programu v PCR cykléru bylo podložní sklo okamžitě vloženo do hybridizační komůrky a inkubováno takto v 37°C přes noc. Další den byly buňky na krycím sklíčku promývány v kapkách (50 – 100  $\mu$ l) roztoků na parafilmu: 15 min na kapce 50% formamidu v 37°C, 8 min na kapce 0,1% Tweenu 20 v 37°C, 3x 4 min na kapce 0,1% Igepalu v 37°C, 3x 2 – 3 min v 1x SSC pufru při pokojové teplotě, 2x 2 – 3 min v PBS při pokojové teplotě. Následně byla značena biotinylovaná DNA sonda metodou nepřímé imunofluorescence (kapitola 3.2.1.7).

#### Použité roztoky:

**1x PBS pro tkáňové kultury**

**methanol : kyselina octová v poměru 3:1**

**RNáza A** (konečná koncentrace 100  $\mu$ g/ml)

**ethanol** (50%, 70%, 80% a 96%)

**1x SSC pufr**

**50% formamid v 2x SSC pufru (pH=7)**

**0,1% Tween 20 v PBS**

**0,1% Igepal v 4x SSC pufru**

### **3.2.7 Práce s bakteriemi**

#### **3.2.7.1 Kultivace bakterií**

Bakterie byly aerobně kultivovány 12 – 16 hod při 37°C v tekutém médiu (2% živný bujón č. 2 nebo TPN médium) v termostátové třepačce nebo na pevném médiu (4% živný agar č. 2) v termostatu. Pro selekci bakteriálních buněk obsahujících plazmid zajišťující antibiotikovou rezistenci bylo do média či agaru přidáno antibiotikum: kanamycin v konečné koncentraci 50  $\mu$ g/ml.

Použité roztoky:

**2% živný bujón č. 2**

**TPN médium**

**4% živný agar č. 2**

**kanamycin** (konečná koncentrace 50 µg/ml)

### **3.2.7.2 Příprava kompetentních buněk pro elektroporaci**

Do 10 ml TPN média byly zaočkovány bakterie kmene XL1blue a kultivovány přes noc v třepačce při 37°C. Další den byla změřena optická denzita (OD) narostlé 30x naředěné kultury při vlnové délce 560 nm a přes noc narostlá kultura byla naředěna do 300 ml TPN média tak, aby výsledná OD byla 0,1. Bakteriální kultura byla kultivována v třepačce, dokud OD nedosáhla 0,5 – 0,7. Poté bylo pracováno stále na ledu a v bakteriálním boxe. Kultura byla centrifugována 10 min při 4°C, 5000 rpm (centrifuga 3K30, rotor 19776-H), pelet byl resuspendován ve 300 ml vychlazené (4°C) sterilní ddH<sub>2</sub>O. Dále byl roztok centrifugován za stejných podmínek a následně promyt ve 150 ml vychlazené (4°C) sterilní ddH<sub>2</sub>O, následně v 16 ml vychlazeného (4°C) sterilního 10% glycerolu, poté v 8 ml vychlazeného (4°C) sterilního 10% glycerolu a nakonec byl pelet resuspendován v 1 ml vychlazeného (4°C) sterilního 10% glycerolu. Buňky byly rozděleny po 100 µl do mikrozkupek, zamrazeny v tekutém dusíku a uskladněny v -80°C.

Použité roztoky:

**TPN médium**

**sterilní vychlazený (4°C) 10% glycerol**

**sterilní vychlazená (4 °C) demineralizovaná voda**

### **3.2.7.3 Transformace bakteriálních buněk elektroporací**

Kompetentní bakteriální buňky XL1blue byly pomalu rozmrazeny na ledu. V mikrozkupe bylo smícháno 50 µl kompetentních buněk s 1 – 2 µl DNA, směs byla promíchána a inkubována 1 min na ledu a poté byla převedena do elektroporační kyvety předem vychlazené na ledu (vzdálenost elektrod 2 mm). Kyveta byla vložena mezi elektrody a byl aplikován puls při kapacitanci 25 µF, napětí 2,5 kV a odporu 200 Ω. Délka pulzu byla v rozmezí 4,5 – 5 ms. K buňkám byl okamžitě přidán 1 ml SOC média. Směs byla převedena do sterilní 100 ml kultivační nádoby a buňky byly inkubovány 1 hod při 37°C v třepačce.

Poté došlo k vysetí transformovaných bakterií v různém ředění na bakteriální miskky s agarem obsahujícím kanamycin (finální koncentrace 50 µg/ml). Po vysetí byly miskky s bakteriemi inkubovány přes noc při 37 °C.

Použité roztoky:

**SOC médium**

**4% živný agar č. 2**

**kanamycin** (konečná koncentrace 50 µg/ml)

#### **3.2.7.4 Skladování bakterií**

Krátkodobě byly bakterie skladovány na miskách s agarem při 4°C. Pro dlouhodobé skladování byly připraveny bakteriální konzervy. Přes noc narostlé bakterie v tekutém médiu byly smíchány se sterilním glycerolem tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 20%. Konzervy s bakteriemi byly skladovány při -80°C.

Použité roztoky:

**40% glycerol v ddH<sub>2</sub>O**

**2% živný bujón č. 2**

#### **3.2.7.5 Indukce bakterií k produkci požadovaného proteinu pomocí IPTG**

Do 10 ml 2% živného bujónu č. 2 se selekčním antibiotikem byla zaočkována monokolonie bakterií obsahující požadovaný DNA konstrukt a suspenze byla inkubována přes noc v třepačce při 37°C. Další den byla bakteriální kultura naředěna 50x do 20 ml živného bujónu v případě prvotního zjišťování produkce žádaného proteinu nebo do 100 ml živného bujónu za účelem izolace požadovaného proteinu. Kultura byla aerobně inkubována v třepačce při 37°C, dokud nedosáhla optická denzita při vlnové délce 600 nm hodnot 0,6 – 0,8. Poté bylo k bakteriální kultuře přidáno IPTG o konečné koncentraci 1 mM a suspenze byla dále inkubována v třepačce 2 hod při 28°C. Následně byla bakteriální kultura přemístěna do zkumavek, stočena (2 min., 4000g, 4°C) a suchý pelet s inhibitorem proteáz PMSF o konečné koncentraci 100 µg/ml byl uskladněn při -20°C.

Použité roztoky:

**2% živný bujón č. 2**

**IPTG** (zásobní roztok 100 mM)

**PMSF** (zásobní roztok 10 mg/ml)

### **3.2.8 Práce s DNA**

#### **3.2.8.1 Agarózová elektroforéza**

Agarózový gel o koncentraci 0,8 – 1% byl připraven povařením odpovídajícího množství agarózy v 0,5x TBE pufru. Po ochlazení roztoku na cca 50°C byla směs nalita do plastového bločku a byl přidán ethidium bromid o konečné koncentraci 0,5 µg/ml. Vzápětí byl do roztoku vložen hřeben a gel byl nechán 20 – 30 min tuhnout. Poté byl bloček s gelem přemístěn do elektroforetické aparatury a po vyndání hřebenu byl gel přelit 0,5x TBE pufrem. Vzorky DNA byly smíchány s komerčním vzorkovým pufrem 6x Orange DNA Loading Dye (Fermentas) a nanесeny do jamek. Dále byl také nanесen DNA marker. Aparatura byla zapojena ke zdroji stejnosměrného proudu a DNA putovala gelem při napětí 5V/cm. Po skončení elektroforézy byl gel prohlédnut pod UV transluminátorem.

Použité roztoky:

**agaróza pro elektroforézu**

**0,5x TBE pufr**

**ethidium bromid**

**6x Orange DNA Loading Dye (Fermentas)**

#### **3.2.8.2 Minipreparace plazmidové DNA alkalickou metodou**

Do mikrozku mávek se 700 µl živného bujónu č. 2 se selekčním antibiotikem byly zaočkovány monokolonie bakterií vyrostlých na miskách s pevným médiem a antibiotikem po elektroporaci. Bakterie byly inkubovány přes noc při 37°C na třepačce. Další den byly bakteriální buňky stočeny (5 min, 4000g, 4°C) a pelet byl resuspendován ve 250 µl roztoku I. Následně bylo přidáno 250 µl čerstvě připraveného roztoku II a směs byla opatrně promíchána. Po přidání 200 µl ledově vychlazeného roztoku III a opatrném promíchání byla směs inkubována 10 min na ledu. Po centrifugaci (10 min, 17 530g, 4°C) byl supernatant přemístěn do nové mikrozku mávky a bylo k němu přidáno 500 µl izopropanolu.

Směs byla důkladně promíchána a inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Po centrifugaci (20 min, 20 000g, pokojová teplota) byl pelet promyt 70% ethanolem a opět stočen při stejných podmínkách a následně vysušen. Pelet byl rozpuštěn ve 20 µl ddH<sub>2</sub>O spolu s RNázou a inkubován 1 hod při 37°C. Vyizolovaná plazmidová DNA byla použita jako templát pro PCR reakci (kapitola 3.2.8.8) za účelem nalezení pozitivní monokolonie obsahující požadovaný DNA konstrukt. Jako templát byl použit 1 µl 1000x ředěné plazmidové DNA (1 ng).

#### Použité roztoky:

##### **2% živný bujón č. 2**

**RNáza A** (konečná koncentrace 100 µg/ml)

**Roztok I:** 50 mM glukóza, 25 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 10 mM EDTA-NaOH (pH = 8,0)

**Roztok II:** 0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS

**Roztok III:** 60 ml 5 M octanu draselného, 11,5 ml ledové kyseliny octové, 28,5 ml dH<sub>2</sub>O (3 M KAc, 2 M ledová kyselina octová)

**izopropanol**

**70% ethanol**

#### **3.2.8.3 Minipreparace plazmidové DNA pomocí kitu QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen)**

Přes noc narostlá bakteriální kultura (15 ml) byla resuspendována v 750 µl pufru P1. Po přemístění směsi do mikrozkušavek bylo přidáno 750 µl pufru P2 a směs byla promíchána otáčením zkumavkou 4 – 6x. Následně bylo přidáno 1050 µl pufru N3 a ihned bylo vše promícháno otáčením zkumavkou 10x. Suspenze byla centrifugována 10 min při 20 000g a poté přepipetována do tří kolonek QIAprep spin columns. Směs byla stočena 1 min na stolní centrifuze na maximální otáčky a přebytečná kapalina byla vyhozena. Membrána kolonky byla promyta 500 µl pufru PB, směs byla centrifugována a přebytečná kapalina odstraněna. Kolonka byla dále promyta 750 µl pufru PE a následně 2x stočena pro úplné odstranění promývacího pufru. DNA byla z každé kolonky eluována 52 µl ddH<sub>2</sub>O.

#### Použité roztoky:

**pufr P1, pufr P2, pufr N3, pufr PB, pufr PE** (součást QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit)



#### 3.2.8.4 Deproteinace DNA upraveným fenolem a chloroformem

K roztoku DNA byl přidán 1 objem upraveného fenolu, směs byla důkladně promíchána na vortexu a centrifugována na stolní centrifuze 5 min při 15 000 rpm. Vrchní fáze byla odebrána a smíchána s 0,5 objemem upraveného fenolu a s 0,5 objemem upraveného chloroformu. Směs byla důkladně promíchána na vortexu a stočena za stejných podmínek. Dále byla odebrána horní fáze a přecházející krok byl opakován, dokud nezmizela mezifáze tvořená vysráženými proteiny. Následně byl přidán 1 objem upraveného chloroformu, důkladně promíchán a opět centrifugován. Vrchní fáze byla odebrána a v ní obsažená DNA byla sražena ethanolem (kapitola 3.2.8.5).

##### Použité roztoky:

**upravený fenol:** destilovaný, pufrovaný 1 M Tris-HCl (pH=8), s přidáním 0,1% 8-hydroxycholínu (upraveno výrobcem)

**upravený chloroform:** chloroform s izoamylalkoholem v poměru 24:1

#### 3.2.8.5 Srážení DNA etanolem

K roztoku DNA bylo přidáno 0,1 objemu 3 M octanu sodného a 2,5 – 3 objemy 96% ethanolu vychlazeného na -20°C. Směs byla důkladně promíchána na vortexu a inkubována 1 hod při -20°C, poté byla centrifugována 25 min při 15 300 rpm a 4°C (mikrocentrifuga Microfuge R, rotor F241.5). Pelet byl promyt 70% ethanolem a sedimentován centrifugací (25 min, 15 300 rpm, pokojová teplota). Pelet byl po vysušení rozpuštěn v odpovídajícím množství ddH<sub>2</sub>O nebo TE pufru.

##### Použité roztoky:

**3 M octan sodný (pH=5,2)**

**96% a 70% ethanol**

**TE pufr**

#### 3.2.8.6 Štěpení DNA restrikčními enzymy

DNA byla štěpena v restrikční směsi (celkový objem 150 – 200 µl):

2 – 11 µg DNA

15 – 20 µl 10x koncentrovaného pufru pro restrikční enzymy

10 – 60 U restrikčního enzymu

ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 150 – 200 µl

Pokud byl použit v restrikční směsi pouze jeden enzym, byl přidán pufr specifický pro daný enzym. Pokud byly použity enzymy BamH I a Xho I najednou, byl použit pufr pro enzym BamH I a enzymu Xho I bylo ve směsi dvojnásobné množství. Tento postup je doporučen výrobcem (<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>). Restrikční enzym byl do směsi přidán jako poslední. Restrikční směs byla po promíchání inkubována přes noc při 37°C. Výsledek reakce byl ověřen elektroforeticky.

Použité roztoky:

**restrikční enzymy: BamH I a Xho I**

**restrikční pufr: specifický pro BamH I a Red (10x) – konečná koncentrace 1x**

### **3.2.8.7 Defosforylace vektorové DNA**

Konce vektorové DNA po štěpení restrikčními enzymy byly defosforylovány pomocí alkalické fosfatázy ve směsi:

85 µl štěpené DNA

10 µl 10x pufru FastAP<sup>TM</sup>

4 µl alkalické fosfatázy FastAP<sup>TM</sup>

1 µl ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 100 µl

Směs byla inkubována 1 hod při 37°C a poté byla reakce zastavena zahřátím směsi na 75°C po dobu 5 min. Vektorová DNA byla následně deproteinována fenolem a chloroformem (kapitola 3.2.8.4) a následně sražena ethanolem (kapitola 3.2.8.5) a rozpuštěna v 25 µl ddH<sub>2</sub>O.

Použité roztoky:

**10x pufr FastAP<sup>TM</sup>**

**alkalická fosfatáza FastAP<sup>TM</sup>**

### 3.2.8.8 Amplifikace DNA pomocí metody PCR

Byla namíchána reakční směs o celkovém objemu 50  $\mu$ l:

- 39,5  $\mu$ l sterilní přefiltrované ddH<sub>2</sub>O
- 5  $\mu$ l 10 $\times$  koncentrovaného Thermo Pol pufru (New England BioLabs)
- 1,5  $\mu$ l 10  $\mu$ M primeru 1 (MV\_počátek)
- 1,5  $\mu$ l 10  $\mu$ M primeru 2 (MV\_konec)
- 1  $\mu$ l 10 mM dNTP
- 1  $\mu$ l 100x ředěného templátu c734A
- 0,5  $\mu$ l DNA polymerázy Vent

Pokud bylo reakčních směsí více, byly míchány na ledu. Po smíchání všech složek byla směs důkladně promíchána a následně krátce stočena ze stěn mikrozkuhavky. Mikrozkuhavka byla vložena do PCR cykléru a byl zvolen program obsahující následující kroky:

1. krok (denaturace DNA): 3 min 94°C
2. krok (denaturace DNA): 40 s 94°C
3. krok (hybridizace primerů k templátu): 50 s 54°C (teplota je specifická pro použité primery)
4. krok (polymerace): 1 min 72°C
5. krok (polymerace): 7 min 72°C
6. krok (konec reakce): 4°C

Kroky 2 – 4 byly cyklicky opakovány 30x.

#### Použité roztoky:

**10 $\times$  koncentrovaný Thermo Pol pufr** (New England BioLabs)

**10  $\mu$ M primer 1** (MV\_počátek)

**10  $\mu$ M primer 2** (MV\_konec)

**10 mM dNTP**

**100x ředěný templát c734A**

**DNA polymeráza Vent**

### 3.2.8.9 Izolace DNA z agarózového gelu kitem NucleoSpin® Extract II

DNA fragment našeho zájmu byl separován v 1% agarózovém gelu (kapitola 3.2.8.1) a pod UV transluminátorem byl následně vyříznut skalpelem požadovaný fragment DNA v agarózovém gelu tak, aby bylo přebytečného gelu vyříznuto co nejméně. DNA v gelu byla přenesena do mikrozkuhavky.

Na každých 100 mg gelu bylo přidáno 200  $\mu$ l pufru NT. Směs byla inkubována v 50°C 10 – 15 min a mezitím vortexována, dokud se gel úplně nerozpustil. Směs byla převedena do kolonky NucleoSpin® Extract II column, která byla umístěna ve sběrné zkumavce a stočena 1 min při 11 000g na stolní centrifuze. Membrána v kolonce byla promyta 700  $\mu$ l pufru NT3 a opět centrifugována (1 min, 11 000g). K úplnému odstranění ethanolu v pufru NT3 z membrány byla kolonka opět centrifugována (2 min, 11 000g) a inkubována v 70°C 2 min. Nakonec byla DNA z membrány kolonky eluována 15 – 50  $\mu$ l NE pufru přehřátého na 70°C inkubací 2 min při pokojové teplotě a následnou centrifugací (2 min, 11 000g).

#### Použité roztoky:

**pufr NT, pufr NT3, pufr NE** (součást kitu NucleoSpin® Extract II)

#### **3.2.8.10 Ligace DNA**

Ligační směs byla připravena tak, aby molekulární poměr vektorové DNA a vkládaného fragmentu byl 1:3. Ligační směs měla celkový objem 20  $\mu$ l a skládala se z následujících složek:

- 200 ng naštěpené a defosforylované vektorové DNA
- 40 ng naštěpeného fragmentu získaného pomocí PCR
- 2  $\mu$ l 10x koncentrovaného pufru pro T4 DNA ligázu
- 2,5U T4 DNA ligázy
- ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 20  $\mu$ l

Pokud bylo pomocí ligace testováno správné naštěpení PCR fragmentu restrikcními enzymy, bylo složení ligační směsi obdobné, ale celkový objem reakce byl 15  $\mu$ l:

- 150 ng naštěpeného fragmentu získaného pomocí PCR
- 1,5  $\mu$ l 10x koncentrovaného pufru pro T4 DNA ligázu
- 2,5U T4 DNA ligázy
- ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 15  $\mu$ l

Směs byla po promíchání inkubována přes noc ve 22°C. Další den byla T4 DNA ligáza deaktivována zahřátím směsi na 65°C po dobu 10 min. Takto připravená směs vektorové DNA s fragmentem byla použita pro transformaci bakterií elektroporací (kapitola 3.2.7.3). V případě testování správného štěpení PCR fragmentu byl výsledek sledován pomocí agarózové elektroforézy (kapitola 3.2.8.1) (bez předešlé deaktivace ligázy).

Použité roztoky:

**10x koncentrovaný pufr pro T4 DNA ligázu**

**T4 DNA ligáza**

#### **3.2.8.11 Stanovení nukleotidové sekvence DNA**

Nejprve byl vyizolován plazmid, u kterého bylo žádoucí znát nukleotidovou sekvenci pomocí kitu QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) (kapitola 3.2.8.3 s tím rozdílem, že plazmid byl izolován z 5 ml bakteriální kultury). Byly namíchány dvě sekvenační směsi, jedna směs obsahovala tzv. forward primer a druhá tzv. reverse primer. Celkový objem směsi byl 14 µl a jeho složení bylo následující:

500 ng templátu (vyizolovaného plazmidu)

primer o konečné koncentraci 3,2 pmol

ddH<sub>2</sub>O do objemu 14 µl

Směs byla promíchána a uložena při 4°C. Samotná sekvenace byla provedena servisní službou v laboratoři sekvenace DNA na PřF UK Praha. Touto laboratoří byly ke směsi přidány navíc 4 µl Big Dye® sekvenačního pufru a 2 µl Big Dye® Terminator mixu. K vlastní analýze byl použit čtyřkapilární sekvenační přístroj 3130 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

Použité roztoky:

**primer forward (MV\_počátek)**

**primer reverse (MV\_konec)**

### **3.2.9 Práce s proteiny**

#### **3.2.9.1 Příprava bakteriálních vzorků pro SDS-PAGE**

Bakteriální pelet získaný po produkci požadovaného proteinu pomocí IPTG (kapitola 3.2.7.5) byl rozdělen na dvě části. Z jedné byl připraven celobuněčný lyzát a z druhé byla získána pouze frakce rozpustných proteinů. Celobuněčný lyzát byl připraven resuspendováním peletu ve 100µl PBS vychlazeného na 4°C a přidáním 5x koncentrovaného Laemliho pufru v poměru 4:1.

Frakce rozpustných proteinů byla získána tak, že bakteriální pelet byl rozpuštěn ve 100  $\mu$ l PBS vychlazeného na 4°C, suspenze byla 3x zmrazena a rozmrazena v tekutém dusíku a centrifugována (10 min, 20 000g, 4°C). K odebranému supernatantu byl přidán 5x koncentrovaný Laemliho pufr v poměru 4:1. Vzorky byly spolu s Laemliho pufrem 5 min povařeny, krátce centrifugovány a nanесeny do jamek gelu SDS-PAGE.

#### Použité roztoky:

##### **1x PBS pro tkáňové kultury**

**5x Laemliho pufr:** 3% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH=6,8), 50% glycerol (v/v), 25% merkaptoethanol, 0,005% bromfenolová modř (w/v)

#### **3.2.9.2 SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)**

Skla aparatury pro SDS-PAGE byla důkladně umyta, osušena na vzduchu a následně byla sestavena aparatura pro elektroforézu. Mezi skla byla zkušebně nalita ddH<sub>2</sub>O za účelem zjištění, zda skla dobře těsní. Mezi skla byl nalit 15% spodní gel 0,5 – 1 cm pod předem označený spodní okraj hřebene. Gel byl po okraj převrstven ddH<sub>2</sub>O či izobutanolem. Po ztuhnutí gelu (cca 30 min) byla voda či izobutanol odstraněn a skla dobře osušena. Následně byl mezi skla nalit 5% horní gel a ihned byl vložen hřeben. Po polymeraci horního gelu (cca 20 min) byl hřeben vyjmut a skla s gelem byla vložena do aparatury a přelita 1x koncentrovaným Running pufrem až po okraj. Jamky byly pomocí Hamiltonovy jehly vypláchnuty Running pufrem a následně byly do jamek nanесeny vzorky (5 – 20  $\mu$ l) spolu s markerem molekulových vah. Vlastní SDS-PAGE probíhala nejprve při napětí 8 V/cm<sup>2</sup>, dokud vzorky nedorazily na hranici obou gelů (30 min) a poté při napětí 14 V/cm<sup>2</sup>, dokud čelo vzorků označené bromfenolovou modří nedorazilo ke spodnímu okraji gelu (cca 2 hod).

#### Použité roztoky:

<b>15% spodní gel:</b>	6 ml 30% akrylamidu
(celkový objem 12 ml)	4,5 ml 1M Tris-HCl (pH=8,8)
	120 $\mu$ l 10% SDS (Sigma)
	1,25 ml demineralizované vody
	*80 $\mu$ l 10% amonium persulfátu
	*8,5 $\mu$ l TEMEDu

**5% horní gel:** 1 ml 30% akrylamidu  
(celkový objem 6 ml) 0,75 ml 1M Tris-HCl (pH=6,8)  
60 µl 10% SDS (Sigma)  
4,22 ml demineralizované vody  
\*40 µl 10% amonium persulfátu  
\*10 µl TEMEDu

\* přidat těsně před nalitím gelu v uvedeném pořadí

**Running pufr 10x:** 250 mM Tris (pH=8,3), 1,92 M glycín, 1% SDS

**30% roztok akrylamidu:** 29% akrylamid, 1% N,N'-methylenbisakrylamid

### 3.2.9.3 Fixace a barvení gelu po SDS-PAGE

Po skončení SDS-PAGE byl gel fixován 30 min ve fixačním roztoku. Poté byl gel 2x opláchnut v dH<sub>2</sub>O a vložen do barvicího roztoku a inkubován takto přes noc při pokojové teplotě. Barvicí roztok byl slit a ponechán pro příští využití. Gel byl proplachován v dH<sub>2</sub>O několik hodin.

#### Použité roztoky:

**fixační roztok:** 25 ml dH<sub>2</sub>O, 20 ml methanolu, 5 ml kyseliny octové

**barvicí roztok:** 0,5% CBBG250, 3,5% HClO<sub>4</sub>

### 3.2.9.4 Western blot

Nejprve byla připravena nitrocelulózová membrána, papíry Whatman a filtrační papíry odpovídající velikosti spodního gelu (8,5 x 8,5cm). Po skončení SDS-PAGE byl horní gel oddělen od spodního. Spodní gel byl 10 min inkubován v blotovacím pufru a následně byl vytvořen blotovací sendvič pro mokrý western blot. Všechny součásti sendviče byly namočeny v blotovacím pufru. Sendvič byl sestaven do blotovací mřížky takto: podložka ze savé hmoty, papír Whatman, 3x filtrační papír, gel, nitrocelulózová membrána, 3x filtrační papír, papír Whatman a nakonec opět podložka ze savé hmoty. Takto připravený blotovací sendvič v mřížce byl vložen do blotovací aparatury naplněné blotovacím pufrem tak, že nitrocelulózová membrána byla blíže k anodě a gel ke katodě. Přenos proteinů na membránu probíhal 3 hod při 100 V a 250 mA za stálého míchání blotovacího pufru a chlazení aparatury na ledu. Po skončení blotování byla membrána propláchnuta v PBS a dále bylo přistoupeno k imunodetekci proteinů (kapitola 3.2.9.6).

Použité roztoky:

**blotovací pufr:** 25 mM Tris, 195 mM glycin, 20% metanol, pH=8,3

**1x PBS**

### **3.2.9.5 Dot blot**

Vzorky v množství 1 – 5  $\mu$ l byly nakapány na nitrocelulózovou membránu a nechány zaschnout na vzduchu. Poté bylo přistoupeno k imunodetekci proteinů (kapitola 3.2.9.6).

### **3.2.9.6 Imunologická detekce proteinů imobilizovaných na membráně**

Nitrocelulózová membrána byla inkubována v blokačním roztoku - 5% odtučněném mléce v PBS po dobu 30 min při pokojové teplotě nebo přes noc při 4°C. Poté byla membrána propláchnuta v PBS a inkubována 1 hod v primární protilátce ředěné v blokačním roztoku. Protilátka byla 3x odmyta v PBS po dobu 10 min. Následně byla membrána inkubována 30 min se sekundární protilátkou ředěnou v blokačním roztoku a poté byla opět 3x 10 min propláchnuta v PBS. Membrána byla na 30 s vložena do roztoku luminolu a poté do průhledné fólie, na kterou byl položen rentgenový film (Foma). Detekce probíhala ve vyvolávací kazetě v temné komoře. Doba expozice byla 30 s až 5 minut. Po expozici byl film vložen do vývojky a následně do ustalovače. RTG film byl dobře opláchnut v dH<sub>2</sub>O a nechán uschnout.

Použité roztoky:

**blokační roztok:** 5% odtučněné mléko v PBS

**1x PBS**

**roztok luminolu A:**\* 18 ml dH<sub>2</sub>O

2 ml 1M Tris-HCl (pH=8,5)

200  $\mu$ l 0,5% luminalu v DMSO

80  $\mu$ l 1,5% kyseliny p-kumarové v DMSO

**roztok luminolu B:**\* 18 ml dH<sub>2</sub>O

2 ml 1M Tris-HCl (pH=8,5)

20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

\* roztok luminolu byl připraven smícháním roztoků A a B těsně před aplikací na membránu



### 3.2.9.7 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Metoda Bradfordové je založena na reakci barviva Coomassie Brilliant Blue (CBBG250) s bazickými a aromatickými aminokyselinami v proteinech v prostředí kyseliny fosforečné za změny zbarvení roztoku. Byly připraveny kalibrační standardy BSA o koncentraci 0; 0,25; 0,5; 0,75 a 1 mg/ml do stejného pufru, který byl použit při přípravě vzorku (0,15 M roztok NaCl). Byl smíchán 1 ml činidla Bradfordové a 20  $\mu$ l zředěného (v 0,15 M roztoku NaCl) analyzovaného vzorku. Po promíchání směsi a krátké inkubaci při pokojové teplotě byly změřeny absorbance standardů i vzorku při vlnové délce 595 nm. Absorbance naměřených standardů byly vyneseny do grafu a pomocí rovnice regrese byla spočítána koncentrace proteinů ve vzorku.

#### Použité roztoky:

**kalibrační standardy:** BSA v 0,15 M roztoku NaCl (0; 0,25; 0,5; 0,75 a 1 mg/ml)

**činidlo Bradfordové:** CBB-G250 (0,1 mg/ml), 10%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 5% ethanol

### 3.2.9.8 Izolace proteinu s kotvou HisTag pomocí kolon HisTrap FF crude (GE Healthcare)

K suchému bakteriálnímu peletu získanému postupem popsáním v kapitole 3.2.7.5 (100 ml bakteriální kultury) bylo přidáno 10 ml vazebného pufru (5 – 10 ml vazebného pufru na každý gram buněčného peletu) spolu s 2 mg lysozymu (konečná koncentrace 0,2 mg/ml), 200  $\mu$ g DNázy (konečná koncentrace 20  $\mu$ g/ml), 10  $\mu$ l 1 M roztoku  $\text{MgCl}_2$  (konečná koncentrace 1mM) a 1 tabletou koktejlu inhibitorů proteáz Complete Mini, EDTA-free (Roche). Směs byla 30 min inkubována při pokojové teplotě za stálého kývání, poté byla 6x zmrazena a rozmrazena v tekutém dusíku. Kolona HisTrap FF crude byla umístěna do aparatury a promyta 5 ml ddH<sub>2</sub>O. Roztoky byly do kolony nanášeny pomocí injekční stříkačky tak, aby nedocházelo ke vstupu vzduchu do kolony. Rychlost průtoku byla udržována do 1 ml/min. Do kolony byl nanesen vzorek (směs po zmražení a rozmražení v tekutém dusíku) a roztok, který protekl, byl jímán pro pozdější analýzu. Poté byla kolona promyta 10 ml vazebného pufru a protečená tekutina byla opět jímána. Protein obsahující kotvu HisTag byl z kolony eluován 10 ml elučního pufru a eluát byl jímán po 1 ml do mikrozku mávek. Kolona byla promyta 10 ml ddH<sub>2</sub>O a poté 10 ml 20% ethanolu a uskladněna pro další použití. Výsledný eluát a všechny kontrolní sběry byly analyzovány na přítomnost proteinu s kotvou HisTag metodou dot blot (kapitola 3.2.9.5).

Použité roztoky:

**lysozym** (konečná koncentrace 0,2 mg/ml)

**DNáza** (konečná koncentrace 20 µg/ml)

**1 M MgCl<sub>2</sub>** (konečná koncentrace 1 mM)

**tableta koktejlu inhibitorů proteáz Complete Mini, EDTA-free** (Roche)

**vazebný pufr:** 20 mM sodium fosfát, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol (pH=7,4)

**eluční pufr:** 20 mM sodium fosfát, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol (pH=7,4)

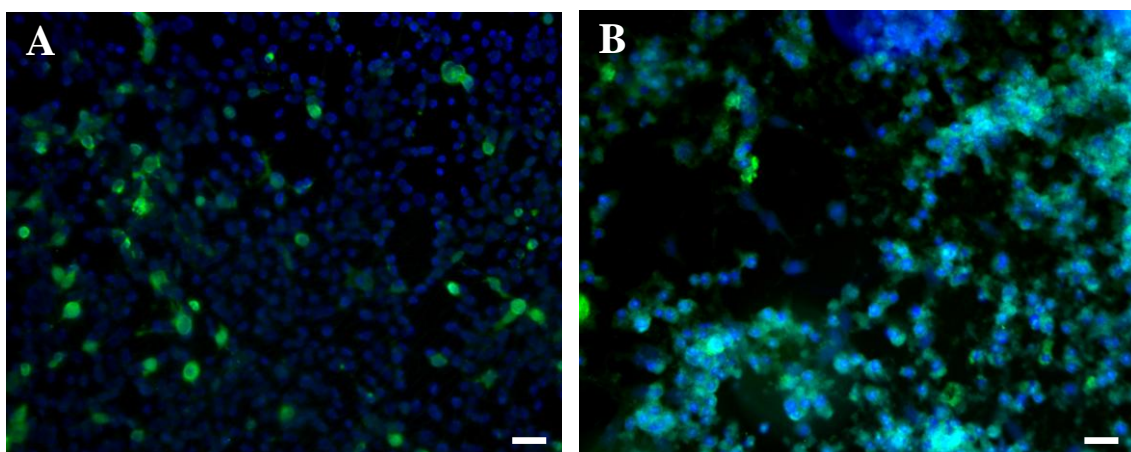
## **4. Výsledky**

## 4.1 IZOLACE POLYOMAVIRŮ

Pro studium vlivu proteazomálního systému hostitelských buněk na časné fáze virové infekce MPyV a SV40 bylo nejdříve nutné zmíněné viry v dostatečném množství vyizolovat.

### 4.1.1 Izolace myšího polyomaviru

Izolace myšího polyomaviru byly prováděny opakovaně. Zde je uveden jeden příklad pomnožení a izolace MPyV, které probíhalo na myších fibroblastech 3T6 narostlých na 20 Petriho miskách o průměru 10 cm. V některých Petriho miskách byla přítomna krycí skla za účelem sledování průběhu infekce, konkrétně dva a šest dní po infekci (Obr. 4.1). V průběhu infekce bylo médium z infikovaných buněk odebráno, zamraženo a následně také použito na izolaci viru. Devátý den po infekci buňky vykazovaly výrazný cytopatický efekt. Infikované buňky byly zamraženy v  $-70^{\circ}\text{C}$  a následně byl virus izolován metodou popsanou v kapitole 3.2.2. Po přečištění viru přes 10% sacharózový polštář byl virus rozdělen do čtyř CsCl gradientů a centrifugován. CsCl gradient byl rozebrán na jednotlivé frakce, v každé frakci byl změřen refraktometrický index (Tab. 4.1) a provedena imunodetekce proteinu VP1 metodou dot blot (Obr. 4.2). Poté byly spojeny jednotlivé frakce obsahující viriony a také frakce prázdných kapsid. Frakce byly přes noc dialyzovány proti B-pufu a následně koncentrovány přes 10% sacharózový polštář. Sediment byl rozpuštěn ve 120 $\mu\text{l}$  B-pufu.

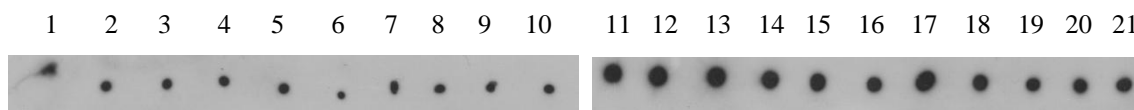


Obr. 4.1: **Průběh infekce myšího polyomaviru v buňkách 3T6.** Imunofluorescenční detekce virového LT antigenu 2 dny (A) a 6 dní (B) po infekci. Byla použita potkaní primární protilátka C4 proti CR T antigenů MPyV (CR=common region, společná část všech tří časných T antigenů MPyV - LT, MT, ST) a sekundární protilátka proti potkaním imunoglobulinům Alexa fluor 488. Úsečka znázorňuje 30  $\mu\text{m}$ .

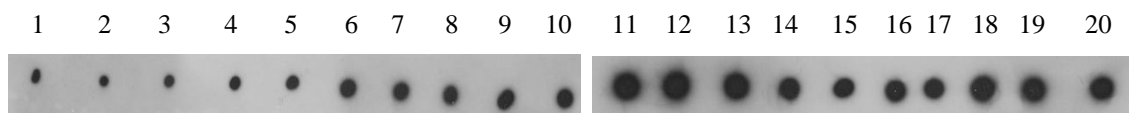
číslo frakce	refraktometrický index			
	Gradient A	Gradient B	Gradient C	Gradient D
1	1,3454	1,3625	1,3603	1,5600
2	1,3733	1,3750	1,3750	1,3750
3	1,3741	1,3735	1,3739	1,3735
4	1,3730	1,3720	1,3720	1,3720
5	1,3701	1,3700	1,3700	1,3683
6	1,3690	1,3690	1,3690	1,3680
7	1,3675	1,3675	1,3675	1,3670
8	1,3673	1,3665	1,3665	1,3660
9	1,3669	1,3654	1,3660	1,3650
310	1,3655	1,3650	1,3651	1,3648
11	1,3650	1,3645	1,3649	1,3645
12	1,3650	1,3640	1,3640	1,3640
13	1,3642	1,3640	1,3638	1,3635
14	1,3640	1,3632	1,3635	1,3630
15	1,3630	1,3629	1,3629	1,3620
16	1,3630	1,3625	1,3624	1,3615
17	1,3613	1,3619	1,3619	1,3600
18	1,3605	1,3609	1,3610	1,3595
19	1,3590	1,3598	1,3598	1,3590
20	1,3580	1,3580	1,3585	1,3580
21	1,3571		1,3575	

Tab. 4.1: **Hodnoty refraktometrických indexů jednotlivých frakcí čtyř CsCl gradientů.** Červeně jsou označeny frakce, v nichž se vyskytují plné viriony – frakce 1 (F1). Zeleně jsou označeny frakce, kde se vyskytují prázdné viriony – frakce 2 (F2).

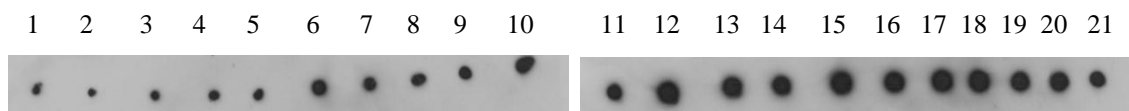
**Gradient A:**



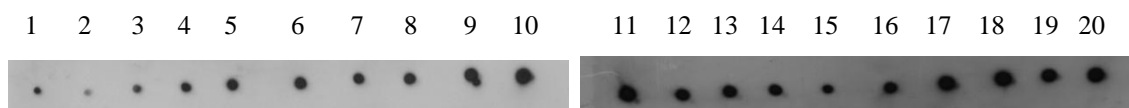
**Gradient B:**



**Gradient C:**



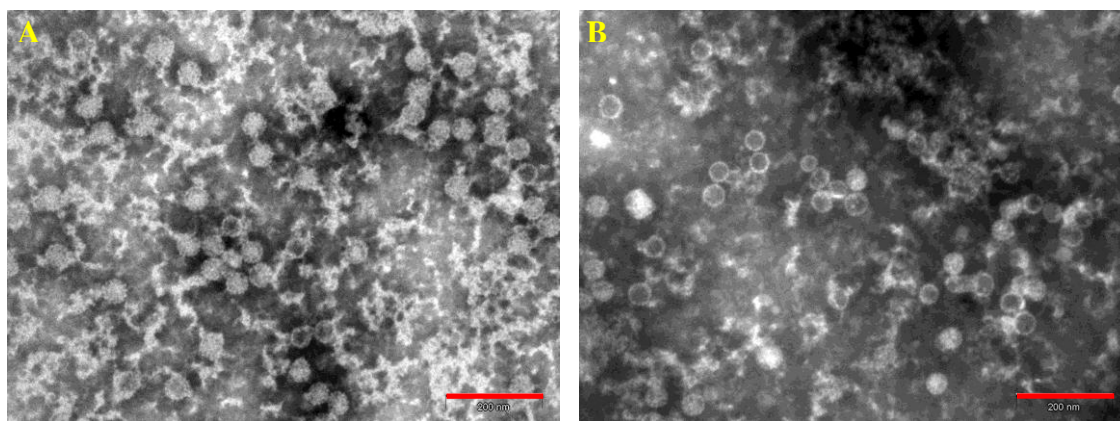
**Gradient D:**



**Obr. 4.2: Imunologická detekce proteinu VP1 v jednotlivých frakcích CsCl gradientu.**

V počátečních frakcích byl signál proteinu VP1 slabý, v následujících frakcích signál sílil. U některých gradientů je lépe rozpoznatelný i druhé maximum intenzity signálu (gradient A a D), který značí frakce prázdných partikulí. Byla použita myší primární protilátka A3 proti VP1 a kozí sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

Virová preparace byla analyzována pomocí elektronové mikroskopie metodou negativního barvení (Obr. 4.3). Frakce 1 obsahovala většinu částic plných a naopak frakce 2 obsahovala většinu prázdných částic. V obou frakcích se vyskytovalo určité množství nečistot. Také byla provedena titrace vyizolovaného virového inokula, tedy určení infekčního titru MPyV pomocí imunologické detekce proteinu LT 24 hpi a také určení hemaglutinačního titru pomocí schopnosti různě ředěného virového inokula aglutinovat červené krvinky (Tab. 4.2).



Obr. 4.3: Snímky vyizolovaného MPyV získané elektronovým mikroskopem. Frakce 1 (A) obsahovala z převážné části plné viriony a ve frakci 2 (B) se vyskytovaly převážně prázdné částice MPyV. Úsečka znázorňuje 200 nm.

	<b>Infekční titr</b> (počet infekčních částic/ml)	<b>Hemaglutinační titr</b> (počet všech částic/ml)
Frakce 1	$6,0 \times 10^7$	$1,6 \times 10^{12}$
Frakce 2	$6,5 \times 10^6$	$2,1 \times 10^{11}$

Tab. 4.2: Infekční a hemaglutinační titr obou frakcí vyizolovaného MPyV.

#### 4.1.1.1 Optimalizace titrace MPyV pomocí průtokové cytometrie

V naší laboratoři je zvykem určovat infekční titr viru pomocí značení proteinu LT či VP1 metodou imunofluorescence. Tato metoda je pro účely zjištění titru viru jistě vhodná, ale její nevýhodou je časová náročnost při vyhodnocování imunofluorescence, kdy je zapotřebí ručně spočítat stovky infikovaných buněk. Další možností, jak určit titr viru, je využít k počítání a identifikaci infikovaných buněk průtokový cytometr. K tomuto nás inspiroval článek Drayman *et al.* (2010), kde metodu titrace s využitím průtokového cytometru zkoušeli na viru SV40. My jsme zde použili MPyV. Buňky 3T6 narostlé na miskách o průměru 6 cm byly infikovány MPyV se stoupající multiplicitou infekce. V každé misce bylo přítomno jedno kulaté krycí sklo o průměru 12 mm. 24 hpi byla sklíčka přendána do 24 jamkové destičky, zafixována a značena protilátkou proti proteinu LT za účelem zjištění titru viru pomocí imunofluorescence.



Infikované buňky na miskách byly také 24 hpi sklizeny, zafixovány a značeny protilátkou proti proteinu LT, abychom změřili množství LT pozitivních buněk na průtokovém cytometru (Tab. 4.3) a následně spočítali titr viru. Tento experiment byl proveden ve dvou nezávislých pokusech, přičemž v každém pokusu jsme pracovali v dubletech. Pro srovnání byla provedena ještě třetí metoda určení titru viru, a to plaková zkouška. Buňky 3T6 nejsou vhodné pro tuto zkoušku, nelze na nich formování plaků dobře vidět. Proto byly na plakovou zkoušku použity buňky MEF. Aby byly zmíněné tři metody titrace viru kompletní co do typů buněk, byl na buňkách MEF také proveden pokus s měřením procenta LT pozitivních buněk stejně jako u buněk 3T6 (Tab. 4.3). Následně byl srovnán titr viru získaný pomocí imunofluorescence a pomocí průtokového cytometru (Tab. 4.4). Všechny tyto experimenty byly provedeny s tímtéž virovým inokulem. Různé způsoby určení titru viru dávají většinou různé výsledky. Výsledek titrace s využitím průtokového cytometru je u buněk 3T6 podobný jako při využití imunofluorescence. Při použití MEF buněk se tyto dvě hodnoty liší o necelý jeden řád a titr získaný plakovou zkouškou na MEF buňkách je také odlišný od titrů získaných na MEF buňkách pomocí průtokové cytometrie (rozdíl cca jeden řád) nebo imunofluorescencí (rozdíl cca dva řády).

A

Multiplicita infekce - MOI	Procento LT pozitivních 3T6 buněk	
	Průtokový cytometr	Imunofluorescence
MOI-0,00034 (0,01μl)	1,25	1,60
MOI-0,00068 (0,02μl)	3,40	1,80
MOI-0,001 (0,03μl)	2,00	4,00
MOI-0,0014 (0,04μl)	2,70	5,80
MOI-0,0017 (0,05μl)	1,90	6,50

B

Multiplicita infekce - MOI	Procento LT pozitivních 3T6 buněk	
	Průtokový cytometr	Imunofluorescence
MOI-0,017 (0,5μl)	0,55	0,58
MOI-0,034 (1μl)	0,75	1,80
MOI-0,051 (1,5μl)	1,53	3,80
MOI-0,068 (2μl)	0,75	1,76
MOI-0,085 (2,5μl)	0,57	2,30

C

Multiplicita infekce - MOI	Procento LT pozitivních MEF buněk	
	Průtokový cytometr	Imunofluorescence
MOI-0,017 (0,438μl)	0,30	1,87
MOI-0,034 (0,88μl)	1,34	6,80
MOI-0,051 (1,3μl)	0,50	8,15

Tab. 4.3: Srovnání procenta LT pozitivních buněk 24 hpi metodou imunofluorescence a pomocí průtokového cytometru. Pokus byl prováděn s buňkami 3T6 (A, B) a MEF (C). Buňky byly nainfikovány s různou multiplicitou infekce, 24 hpi byly zafixovány a byl značen LT antigen pomocí primární potkaní protilátky C4 proti CR T antigenů MPyV a sekundární protilátky proti potkaním imunoglobulinům Alexa fluor 488.

	3T6 buňky (A)	3T6 buňky (B)	MEF buňky (C)
Titř viru určený pomocí průtokového cytometru	$9,33 \times 10^{10}$ u/ml	$2,40 \times 10^9$ u/ml	$1,95 \times 10^9$ u/ml
Titř viru určený pomocí imunofluorescence	$1,31 \times 10^{11}$ u/ml	$3,64 \times 10^9$ u/ml	$1,06 \times 10^{10}$ u/ml
Titř viru určený pomocí plakové zkoušky	-	-	$1,30 \times 10^8$ pfu/ml

Tab. 4.4: **Srovnání titřů MPyV získaných různými metodami.** Lze pozorovat, že různé způsoby určení titř viru nedávají vždy stejné výsledky. Pokud pro titraci využijeme průtoký cytometr je výsledek podobný jako při použití imunofluorescence. Jen u MEF buněk je odchylka téměř jeden řád a u těchto buněk dosahuje jiných hodnot i výsledek plakové zkoušky.

Vzorec výpočtu titř viru z dat získaných průtokovým cytometrem (Drayman *et al.* 2010) nebo imunofluorescencí:

$$\frac{\% \text{ LT pozitivních buněk} \times \text{počet buněk, které byly infikovány}}{\text{ml infikujícího viru}}$$

jednotky: [u/ml]

Vzorec výpočtu titř viru z dat získaných plakovou zkouškou:

$$\frac{\text{průměrný počet plaků vyskytující se na misce při určitém ředění} \times \text{faktor ředění} \times \text{faktor } 1 \text{ ml}}{\text{ml}}$$

jednotky: [pfu/ml]

#### 4.1.2 Izolace viru SV40

Izolace opičího viru SV40 byla provedena z 15 misek o průměru 10 cm porostlých infikovanými Vero buňkami. Infikované Vero buňky byly v průběhu pomnožování viru zpasážovány, aby došlo k většímu rozšíření viru. Virus SV40 byl izolován stejným postupem jako MPyV. Po centrifugaci viru přes 10% sacharózový polštář byl virus rozdělen do tří CsCl gradientů a centrifugován. Poté byl gradient rozebrán na jednotlivé frakce, ve kterých byl změřen refraktometrický index (Tab. 4.5) a provedena imunodetekce proteinu VP1 metodou dot blot (Obr. 4.4). Poté byly spojeny frakce, které obsahovaly viriony a zvlášť frakce obsahující prázdné kapsidy a dále zbytkové frakce.

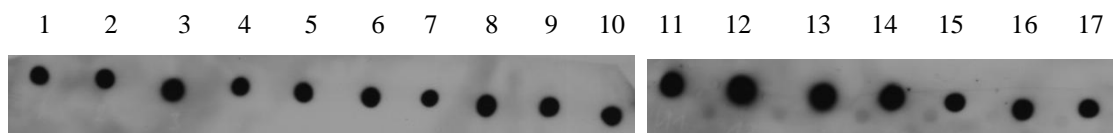
Všechny frakce byly přes noc dialyzovány proti B-pufu a následně koncentrovány přes 10% sacharózový polštář. Sediment byl rozpuštěn ve 100μl B-pufu.

číslo frakce	refraktometrický index		
	Gradient A	Gradient B	Gradient C
1	1,3729	1,3741	1,3732
2	1,3700	1,3735	1,3729
3	1,3677	1,3709	1,3700
4	1,3661	1,3689	1,3682
5	1,3651	1,3668	1,3672
6	1,3640	1,3659	1,3660
7	1,3638	1,3645	1,3646
8	1,3630	1,3637	1,3638
9	1,3620	1,3630	1,3631
10	1,3620	1,3622	1,3621
11	1,3612	1,3615	1,3615
12	1,3605	1,3607	1,3612
13	1,3600	1,3605	1,3610
14	1,3591	1,3603	1,3603
15	1,3582	1,3600	1,3597
16	1,3570	1,3590	1,3580
17	1,3560	1,3573	1,3580
18		1,3560	1,3569
19		1,3550	1,3559
20			1,3550

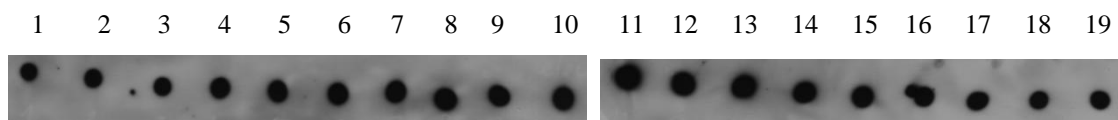
Tab. 4.5: Hodnoty refraktometrických indexů jednotlivých frakcí tří CsCl gradientů.

Červeně jsou označeny frakce, v nichž se vyskytují plné viriony – frakce 1 (F1). Zeleně jsou označeny frakce, kde se vyskytují prázdné viriony – frakce 2 (F2) a modře jsou znázorněny zbytkové frakce – frakce 3 (F3).

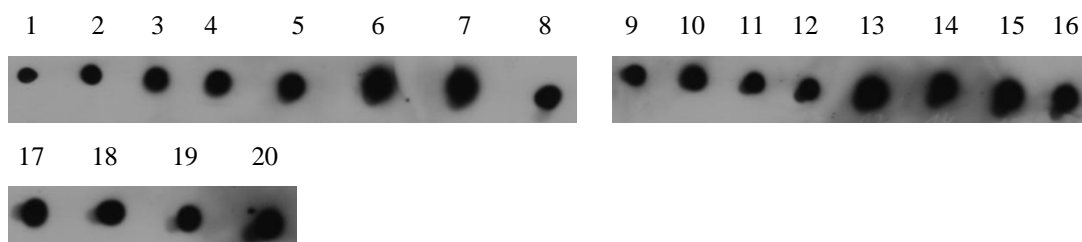
**Gradient A:**



**Gradient B:**



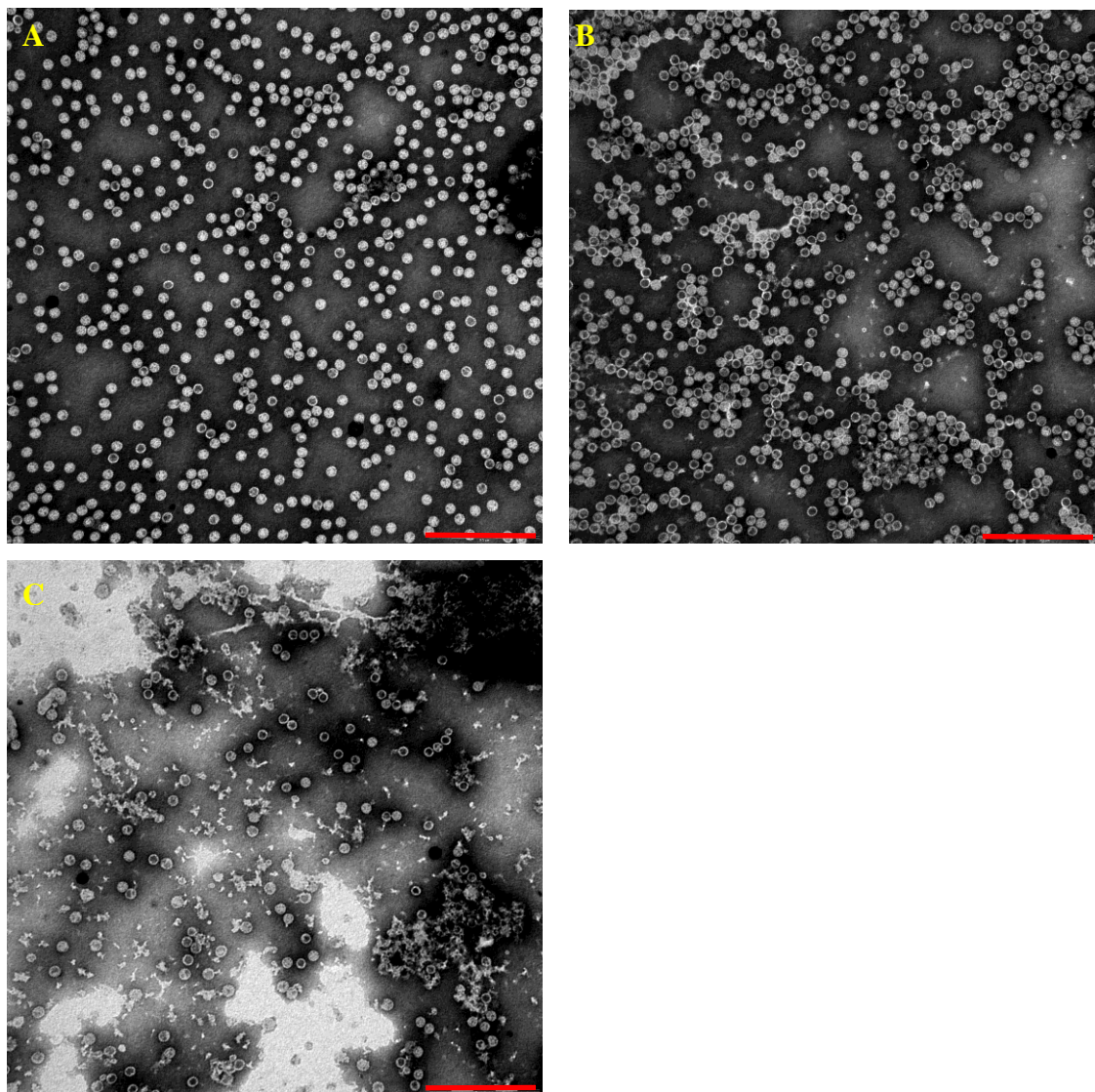
**Gradient C:**



**Obr. 4.4: Imunologická detekce proteinu VP1 v jednotlivých frakcích CsCl gradientu.**

Především u gradientu C lze vidět dvě maxima intenzit signálu VP1, první maximum znázorňuje frakce obsahující viriony a druhé obsahuje frakce prázdných kapsid. Byla použita králičí primární protilátka proti VP1 SV40 a kozí sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

Virová preparace byla analyzována pomocí elektronové mikroskopie metodou negativního barvení (Obr. 4.5). Frakce 1 obsahovala většinu částic plných, ve frakci 2 se vyskytovala většina prázdných částic a frakce 3 neobsahovala mnoho jakýchkoli částic a obsahovala více nečistot než první dvě frakce. Dále byl určen infekční titr viru SV40 pomocí imunologické detekce proteinu LT 40 hpi (Tab. 4.6). Virus SV40 není schopen aglutinovat červené krvinky, hemaglutinační titr tedy nebyl určován.



Obr. 4.5: Snímky vyizolovaného viru SV40 získané elektronovým mikroskopem. Frakce 1 (A) obsahovala z valné většiny plné viriony a ve frakci 2 (B) se vyskytovaly převážně prázdné částice viru SV40. Frakce 3 obsahovala více nečistot a málo virových částic. Úsečka znázorňuje 500 nm.

	<b>Infekční titr</b> (počet infekčních částic/ml)
Frakce 1	$1,0 \times 10^8$
Frakce 2	$1,8 \times 10^8$
Frakce 3	$4,6 \times 10^7$

Tab. 4.6: Infekční titr všech frakcí vyizolovaného viru SV40.

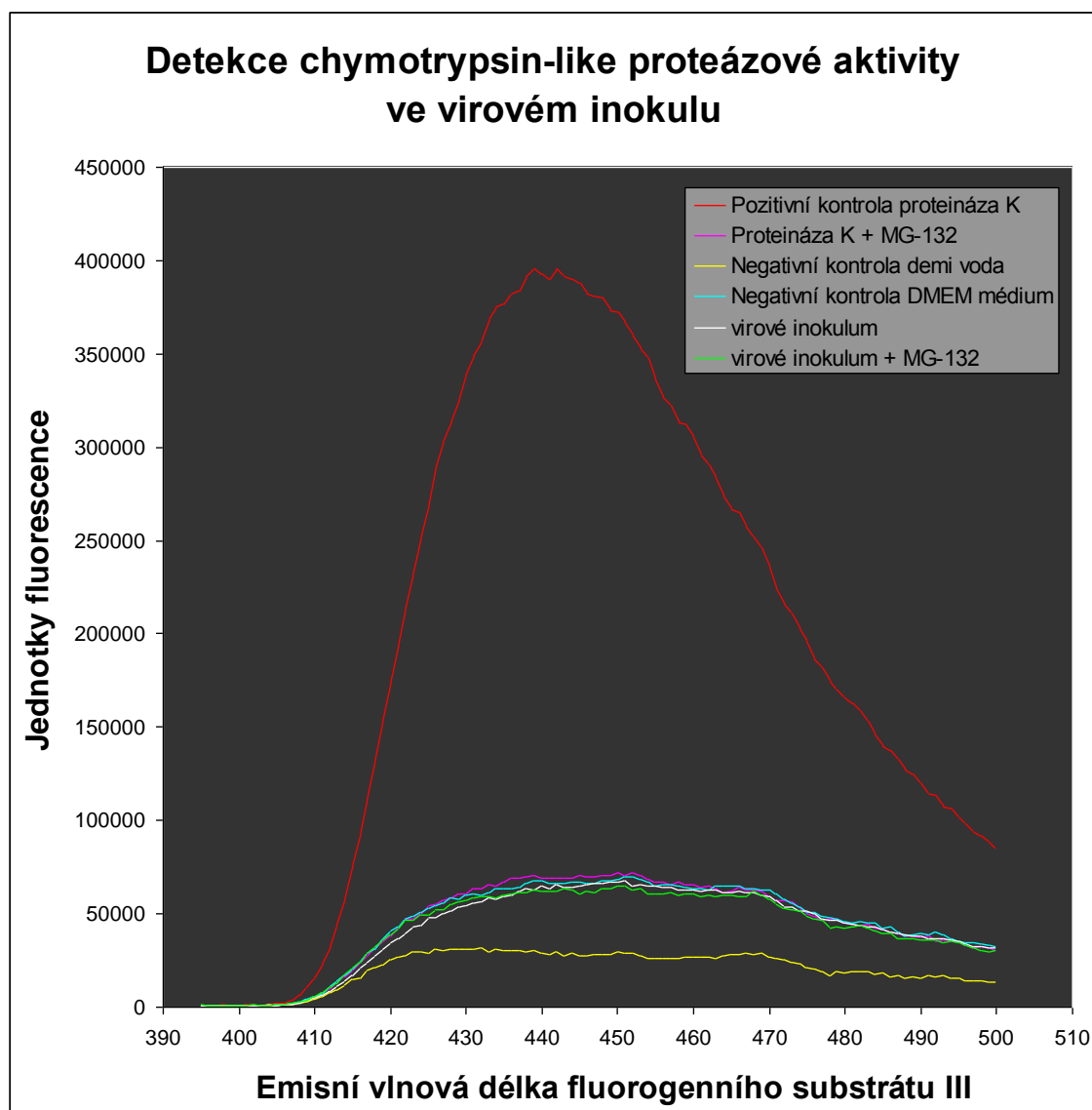
## 4.2 VYLOUČENÍ PROTEOLYTICKÉ AKTIVITY PŘÍTOMNÉ V POUŽÍVANÉM VIROVÉM INOKULU

Většina této diplomové práce se zabývá vlivem proteazomální aktivity na polyomavirovou infekci. V pokusech zde zaznamenaných byly používány inhibitory proteazómů MG-132 a epoxomicin, oba inhibují především chymotrypsinovou aktivitu proteazómů, dále pak trypsinovou a peptidyl-glutamyl peptidázovou aktivitu. Pro studium specifického vlivu proteazómů na polyomavirovou infekci bylo zapotřebí vyloučit přítomnost proteáz lokalizovaných extracelulárně ve virovém inokulu. Během pokusů popsanych v této práci bylo použito více virových inokul, všechny byly testovány na přítomnost proteáz s tímtež negativním výsledkem. Zde je uveden příklad měření jednoho virového inokula. Měření proteolytické aktivity bylo provedeno za použití dvou fluorogenních substrátů, substrátu III - Suc-LLVY-AMC (Calbiochem), který slouží k detekci chymotrypsine-like aktivity a substrátu VI - Z-ARR-AMC (Calbiochem), díky kterému lze detekovat trypsin-like aktivitu. Pokud jsou tyto substráty štěpeny danými proteázami, můžeme detekovat fluorescenci v oblasti 430 – 460 nm (v našem případě při 440 nm). Pokud byla měřena chymotrypsin-like aktivita proteáz pomocí fluorogenního substrátu III, byla použita jako pozitivní kontrola proteináza K (1 µg/ml). V tomto případě jsme detekovali při vlnové délce 440 nm fluorescenci o velikosti 393 000 jednotek. Negativní kontroly – ddH<sub>2</sub>O a DMEM médium vykazovaly maximální fluorescenci 29 000 a 68 000 jednotek. Pokud byl k proteináze K přidán inhibitor proteazómů MG-132 o výsledné koncentraci 20 µM, míra fluorescence se pohybovala na úrovni negativní kontroly. Pokud bylo analýze podrobena virové inokulum, maximální míra fluorescence se pohybovala okolo 64 000 jednotek, což je na úrovni pozadí. Pokud byl k virovému inokulu přidán inhibitor proteazómů MG-132 (20 µM), hodnota maximální míry fluorescence se příliš nezměnila oproti virovému inokulu bez MG-132 (62 000 jednotek) (Obr. 4.6).

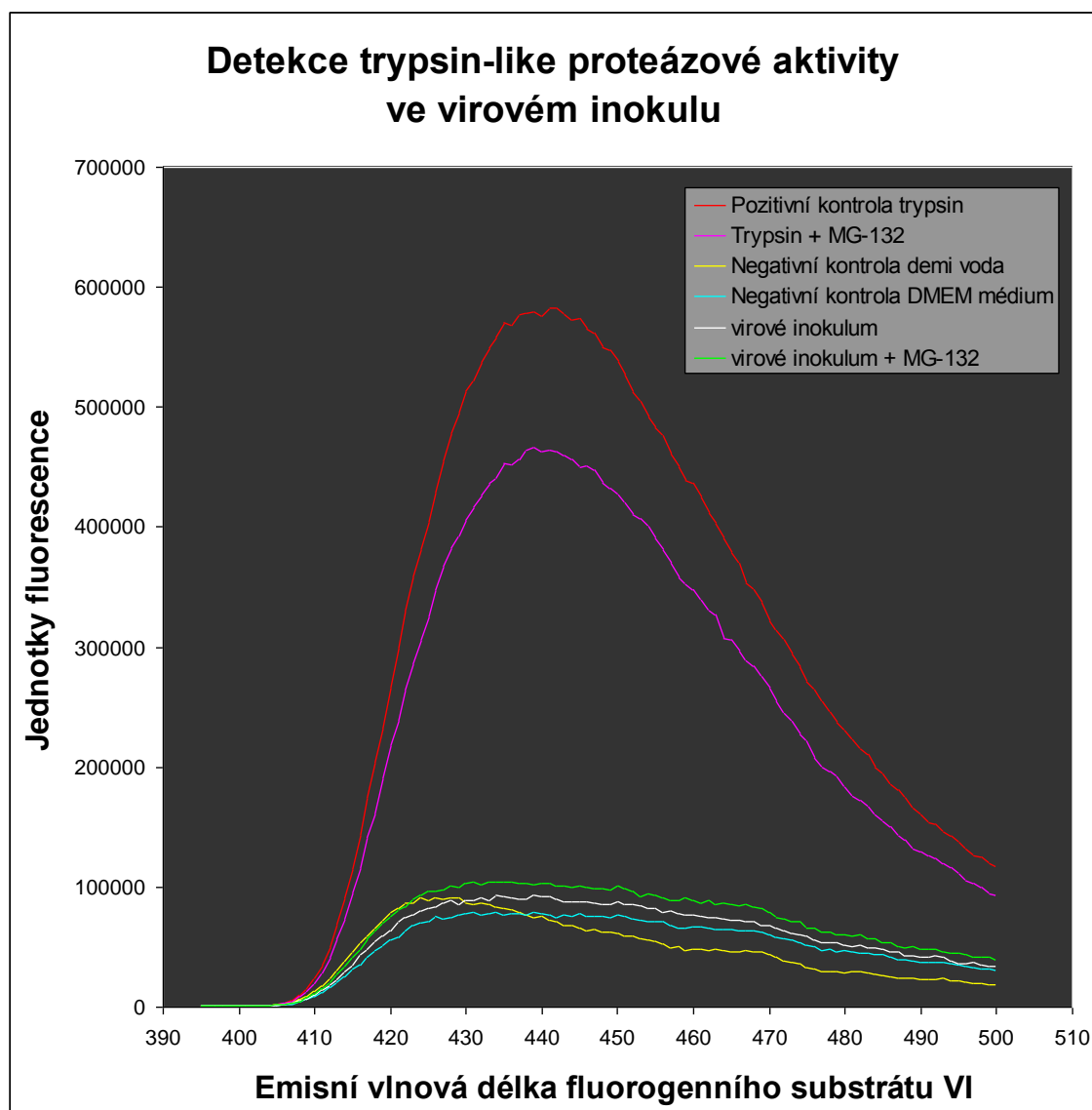
Velmi podobných výsledků bylo dosaženo při sledování trypsin-like aktivity proteáz pomocí fluorogenního substrátu VI. Pozitivní kontrola trypsin (0,005%) dosáhla maximální hodnoty fluorescence 576 000 jednotek. Obě negativní kontroly vykazovaly při emisní vlnové délce 440 nm okolo 76 000 jednotek. Při testování virového inokula byla naměřena hodnota maximální fluorescence 92 000 jednotek, a pokud byl k virovému inokulu přidán inhibitor proteazómů MG-132 (20 µM), maximální míra fluorescence dosáhla 103 000 jednotek. Jedinou výjimkou byl vzorek trypsinu (0,005%) s proteazomálním inhibitorem MG-132 (20 µM). Hodnota fluorescence při vlnové délce 440 nm byla naměřena u tohoto vzorku 463 000 jednotek (Obr. 4.7).

Což je méně než u samotné pozitivní kontroly, ale zároveň je naměřená hodnota vysoko nad negativními kontrolami. Tento výsledek podporuje tvrzení uvedené v informacích od výrobce proteazomálního inhibitoru MG-132, že tento inhibitor je schopen potlačit především chymotrypsin-like aktivitu proteazómů. Obecně z výsledků měření proteáz přítomných ve virovém inokulu vyplývá, že trypsin-like a především pak chymotrypsin-like proteázy, které MG-132 inhibuje, nejsou přítomny v námi používaném virovém inokulu a následné výsledky získané při použití inhibitoru MG-132 nejsou tímto zatíženy. Spektroskopická měření provedl RNDr. Radovan Fišer, Ph.D.





Obr. 4.6: **Detekce chymotrypsin-like proteázové aktivity ve virovém inokulu.** K měření byl použit fluorogenní substrát III (Suc-LLVY-AMC). Na ose x jsou znázorněny emisní vlnové délky fluorogenního substrátu III a osa y označuje jednotky fluorescence. K excitaci byla použita vlnová délka 360 nm. Jako pozitivní kontrola sloužila proteináza K o konečné koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$ . Proteazomální inhibitor MG-132 byl použit o konečné koncentraci 20  $\mu\text{M}$ . Testovány byly 2  $\mu\text{l}$  virového inokula.



Obr. 4.7: **Detekce trypsin-like proteázové aktivity ve virovém inokulu.** K měření byl použit fluorogenní substrát VI (Z-ARR-AMC). Na ose x jsou ukázány emisní vlnové délky fluorogenního substrátu VI a na ose y jsou vyznačeny jednotky fluorescence. K excitaci byla použita vlnová délka 360 nm. Jako pozitivní kontrola byl použit trypsin o konečné koncentraci 0,005%. Proteazomální inhibitor MG-132 byl použit o konečné koncentraci 20  $\mu\text{M}$  a testovány byly 2  $\mu\text{l}$  virového inokula.

### **4.3 VLIV PROTEAZOMÁLNÍ INHIBICE NA PRODUKCI PROTEINU LT V RŮZNÝCH FÁZÍCH INFEKCE MPyV**

Sledování vlivu proteazómů na životní cyklus myšího polyomaviru jsme se rozhodli studovat pomocí inhibitorů proteazómů. Konkrétně jsme zvolili reverzibilní inhibitor proteazómů MG-132 a ireverzibilní inhibitor proteazómů epoxomicin. Výhodou MG-132 je možnost jeho působení po libovolný časový úsek, lze ho odmyt a funkčnost proteazómů se poté obnoví. Na druhou stranu jistou nevýhodou MG-132 je jeho specifita, resp. nespecifita. MG-132 je schopen inhibovat i určité lyzozomální cysteinové proteázy. Z tohoto důvodu jsme vybrali i druhý inhibitor proteazómů epoxomicin, který je více specifický pro proteazómy. Na druhou stranu jeho účinek nelze zrušit. V této diplomové práci jsme se zaměřili na studium vlivu proteazómů na časné fáze infekce - vstup viru do buňky, dopravu virového genomu do buněčného jádra a časnou transkripci T antigenů. Jako ukazatel ovlivnění časných fází infekce proteazómy jsme zvolili míru exprese časného LT antigenu. Těmito pokusy bychom mohli přispět k osvětlení především problematiky dopravy viru buňkou od cytoplazmatické membrány směrem k buněčnému jádru.

#### **4.3.1 Vliv reverzibilního inhibitoru MG-132**

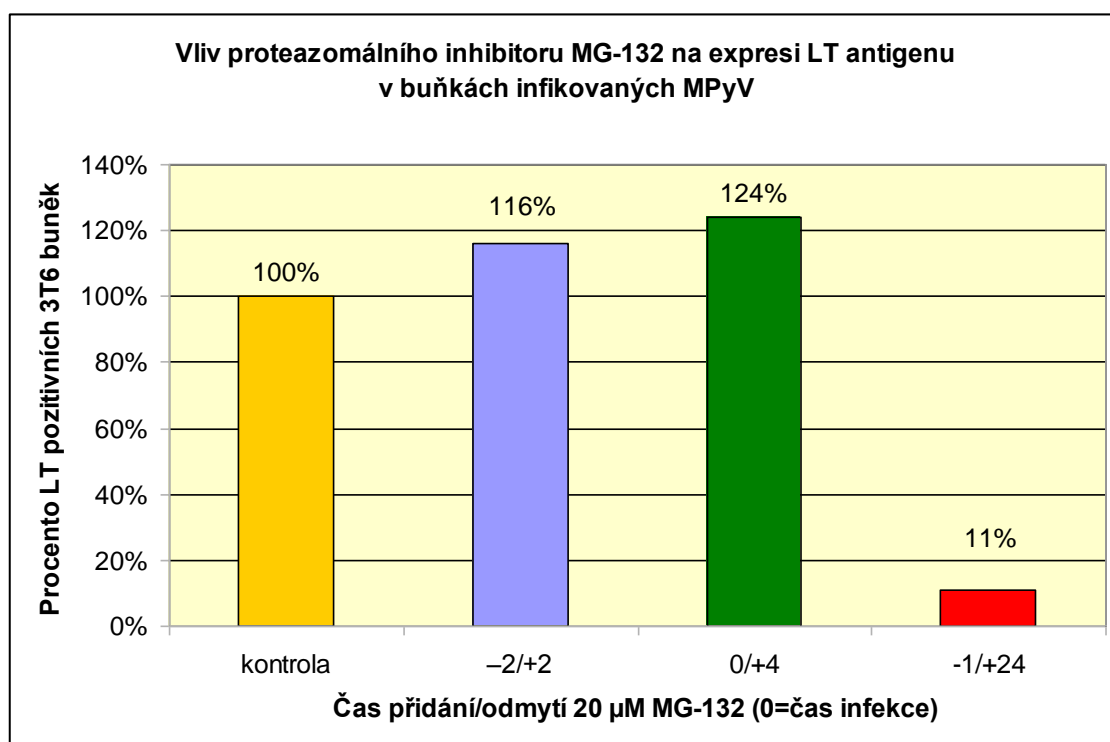
Nejprve jsme se rozhodli studovat vliv proteazomálního systému buňky na polyomavirovou infekci použitím reverzibilního inhibitoru proteazómů MG-132, který jsme nechali působit na buňky po různě dlouhou dobu a především v různé fázi polyomavirové infekce. Následně jsme sledovali expresi virového proteinu LT, který je exprimován jako jeden z prvních virových proteinů poté, co je virová DNA dopravena do jádra. Všechny pokusy zde popsané byly prováděny na myších fibroblastech 3T6 a s myším polyomavirem, který byl otestován na přítomnost proteáz přímo v inokulu (kapitola 4.2).

LT antigen jsme detekovali pomocí protilátek a množství exprese tohoto proteinu jsme se rozhodli měřit na průtokovém cytometru. Využití tohoto přístroje jsme zvolili z důvodu jeho větší citlivosti a dále především z důvodu robustnější statistiky díky měření většího množství buněk ve srovnání s fluorescenční mikroskopií. Další výhodou průtokového cytometru je vysoká rychlost měření buněk a automaticky generovaná statistika ohledně procenta pozitivních buněk. Nejprve byly pokusy provedeny s inhibitorem proteazómů MG-132 o konečné koncentraci 20  $\mu$ M.

Již dříve bylo ověřeno, že krátkodobé působení (do 5 hod) MG-132 až o koncentraci 50  $\mu\text{M}$  není pro buňky cytotoxické (DP, Schenková, 2006; DP, Čáslavský, 2009). Nejdříve byly provedeny pokusy se synchronizovanými buňkami 3T6, které byly narostlé na Petriho miskách o průměru 3 nebo 6 cm. Tyto buňky byly infikovány MPyV s  $\text{MOI}=1$  a v různých fázích infekce byl přidán a následně odmyt inhibitor proteazómů MG-132 (20  $\mu\text{M}$ ). Buňky byly 24 hpi zafixovány a pomocí protilátek byl značen virový protein LT. Označené buňky byly následně analyzovány pomocí průtokového cytometru díky fluoroforu připojenému k sekundární protilátce. Výsledky byly zpracovány, shrnuty do tabulky (Tab. 4.7) a zaneseny do grafu (Obr. 4.8). Tyto výsledky jsou výstupem ze dvou, resp. jednoho nezávislého experimentu, přičemž v každém nezávislém pokusu byly k dispozici dvě paralelní misky ke každé proměnné. Pokud byl MG-132 přidán na buňky 3T6 2 hodiny před infekcí a odmyt 2 hodiny po infekci, stoupl procento LT pozitivních buněk o 16% oproti kontrole, buňkám ošetřeným pouze DMSO (MG-132 je v DMSO rozpuštěn). V případě inhibice proteazomální aktivity po dobu 0 až +4 hpi došlo také k nárůstu procenta LT pozitivních buněk a to o 24%. Pokud byl však MG-132 přítomen na buňkách po celou dobu infekce, 24 hod, procento LT pozitivních buněk prudce kleslo na 11%. Tento pokles je pravděpodobně způsoben negativním vlivem MG-132 na replikaci DNA. Tento efekt jsme pozorovali při pozdějších námi provedených pokusech (kapitola 4.6).

<b>Procento LT pozitivních buněk oproti kontrole (100%) při působení 20 <math>\mu\text{M}</math> MG-132</b>			
<b>Čas přidání/odmytí MG-132 (hod) (0=čas infekce)</b>	<b>-2/+2</b>	<b>0/+4</b>	<b>-1/24</b>
1. nezávislý pokus	118%	115%	11%
2. nezávislý pokus	114%	132%	----
<b>průměr</b>	<b>116%</b>	<b>124%</b>	<b>11%</b>

Tab. 4.7: **Přehled výsledků pokusu studující vliv 20  $\mu\text{M}$  proteazomálního inhibitoru MG-132 na různé fáze časně infekce MPyV.** Expres LT antigenu byla měřena průtokovým cytometrem. Jeden nezávislý pokus je vždy průměrem dvou paralelních vzorků. V případě působení inhibitoru proteazómů MG-132 v čase -2/+2 a 0/+4 došlo k mírnému nárůstu procenta LT pozitivních buněk, naopak v případě přítomnosti MG-132 po celou dobu infekce došlo k výraznému poklesu počtu buněk exprimujících LT.



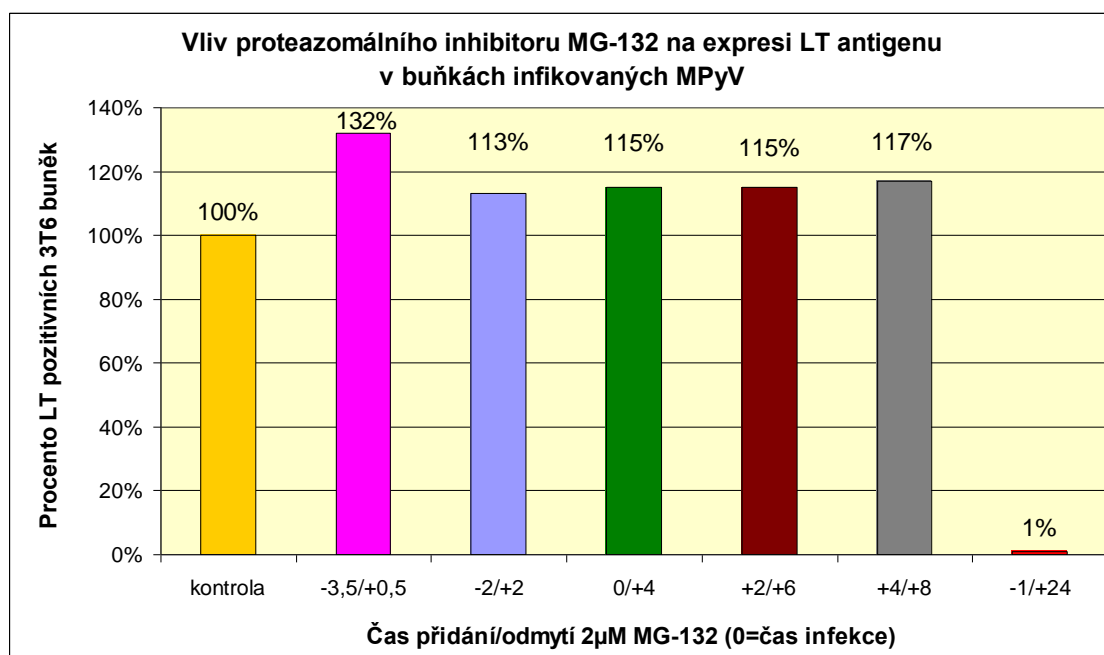
Obr. 4.8: Vliv 20  $\mu$ M inhibitoru proteazómů MG-132 na expresi LT antigenu v buňkách infikovaných MPyV v různých fázích infekce. Grafické znázornění výsledků uvedených v Tab. 4.7. Expresí LT antigenu byla měřena pomocí průtokového cytometru díky spojení sekundární protilátky proti potkaním imunoglobulinům s Alexa fluor 488. Primární protilátka byla použita potkaní proti CR T antigenů MPyV (CR=common region, společná část všech tří časných T antigenů MPyV - LT, MT, ST).

Z pokusů popsaných v kapitole 4.5 jsme zjistili, že použití 20  $\mu$ M MG-132 při 25 hod přítomnosti v kultuře je pro buňky 3T6 cytotoxické. Proto jsme se rozhodli výše popsané pokusy zopakovat s použitím 2  $\mu$ M MG-132 (Johnson a Samulski 2009, Tran *et al.* 2010) a navíc jsme rozšířili zkoumání vlivu proteazomální inhibice ještě na další fáze časné infekce MPyV. Pokus byl proveden stejným způsobem jako při použití 20  $\mu$ M MG-132. Synchronizované buňky 3T6 narostlé na Petriho miskách o průměru 3 cm byly infikovány MPyV s MOI=1. V různých fázích infekce byl přidán a odmyt proteazomální inhibitor MG-132 o konečné koncentraci 2  $\mu$ M, ale vždy byl na buňkách přítomen 4 hodiny. Konkrétně se jednalo o časy přidání/odmytí: MG-132 -3,5/+0,5 hod, -2/+2 hod, 0/+4 hod, +2/+6 hod, +4/+8hod a -1/+24hod, přičemž 0 byl čas infekce. Buňky byly sklizeny 24 hpi a značeny protilátkou proti časnému LT antigenu. Následně byly buňky analyzovány průtokovým cytometrem. Zpracované výsledky jsou shrnuty v Tab. 4.8 a na Obr. 4.9 je grafický přehled těchto výsledků.

K největšímu nárůstu procenta LT pozitivních buněk došlo v případě, kdy byl inhibitor proteazómů MG-132 přidán na buňky 3,5 hod před infekcí a odmyt 0,5 hodiny po infekci. V tomto případě jsme detekovali nárůst 32%. V případě, že byl MG-132 přítomen na buňkách po celou dobu infekce, opět kleslo procento LT pozitivních buněk na minimum, bylo naměřeno 1% buněk exprimujících protein LT. Ve všech ostatních časech působení MG-132, konkrétně v časech -2/+2, 0/+4, +2/+6, +4/+8 (přidání/odmytí), se procento LT pozitivních buněk mírně zvýšilo a ve všech těchto případech se pohybovalo zvýšení okolo 15%.

<b>Procento LT pozitivních buněk oproti kontrole (100%) při působení 2 <math>\mu</math>M MG-132</b>						
<b>Čas přidání/odmytí MG-132 (hod) (0=čas infekce)</b>	-3,5/+0,5	-2/+2	0/+4	+2/+6	+4/+8	-1/24
1. paralela	130%	109%	120%	117%	106%	1%
2. paralela	133%	117%	109%	113%	128%	1%
<b>průměr</b>	<b>132%</b>	<b>113%</b>	<b>115%</b>	<b>115%</b>	<b>117%</b>	<b>1%</b>

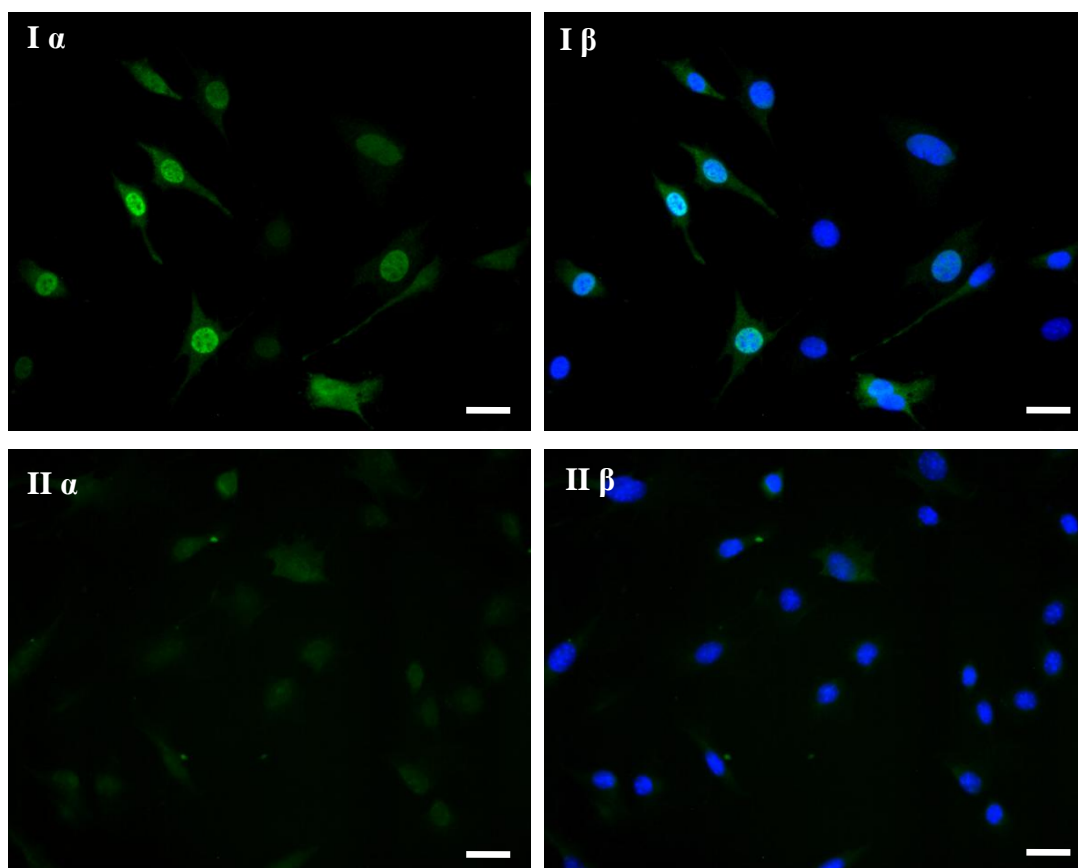
Tab. 4.8: Přehled výsledků pokusu studující vliv 2  $\mu$ M proteazomálního inhibitoru MG-132 na různé fáze časně infekce MPyV. Expres proteinu LT byla měřena průtokovým cytometrem. V tabulce jsou znázorněny výsledky jednoho pokusu provedeného ve dvou paralelách a konečný výsledek je průměrem těchto dvou paralel. V případě působení MG-132 v čase -3,5/+0,5 došlo k nejvyššímu nárůstu LT pozitivních buněk, a to o 32%. Pokud byl inhibitor přítomen na buňkách po celou dobu infekce došlo k poklesu počtu buněk exprimujících LT na minimum. Ve všech ostatních časech působení MG-132 se pohyboval nárůst LT pozitivních buněk okolo 15%.



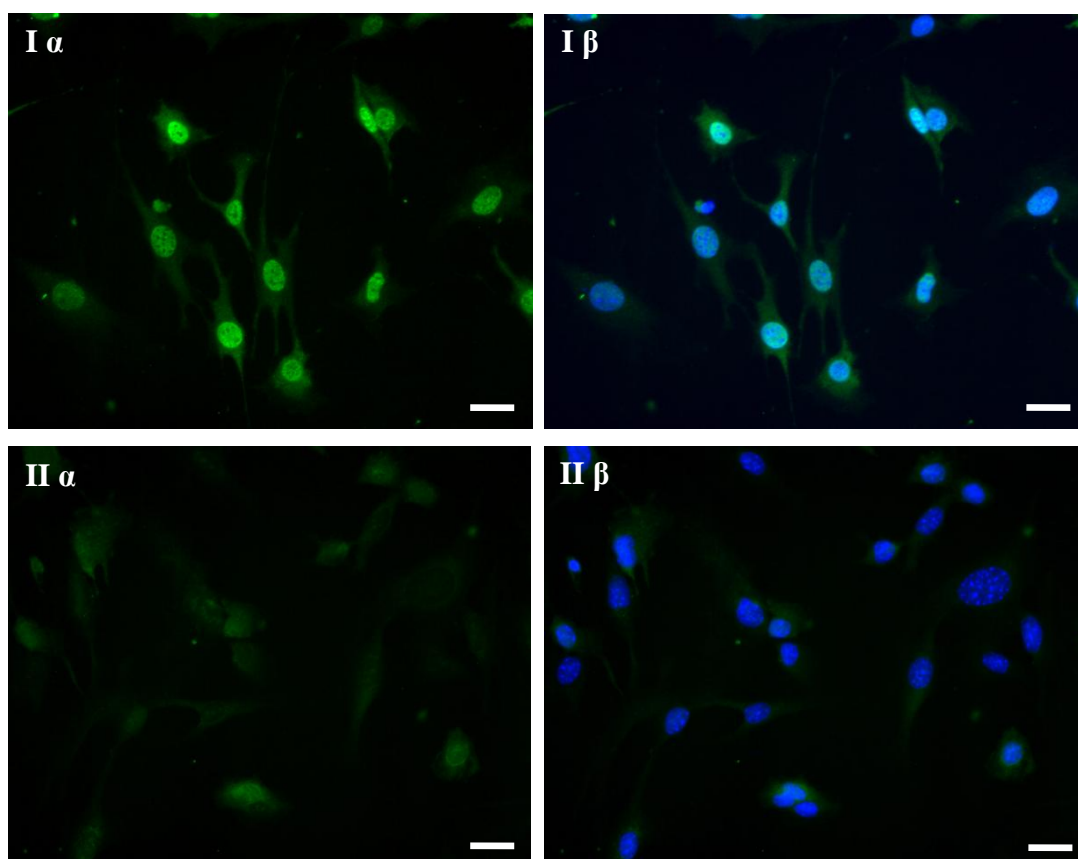
Obr. 4.9: **Vliv 2 µM inhibitoru proteazómů MG-132 na expresi LT antigenu v buňkách infikovaných MPyV v různých fázích infekce.** Grafické znázornění výsledků uvedených v Tab. 4.8. Expze LT antigenu byla měřena pomocí průtokového cytometru díky spojení sekundární protilátky proti potkaním imunoglobulinům s Alexa fluor 488. Primární protilátka byla použita potkaní proti CR T antigenů MPyV.

Z experimentů provedených v naší laboratoři víme, že produkci proteinu LT lze pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu nejdříve okolo 10 hpi. Proto jsme se dále rozhodli sledovat, zda bude docházet k produkci LT antigenu i v případě, kdy buňky opůsobíme 2 µM inhibitorem proteazómů MG-132 celých 10, eventuelně 12 hodin infekce. Pokus byl proveden s buňkami 3T6 na mikroskopických sklíčkách. Synchronizované buňky byly infikovány MPyV s multiplicitou 3. K buňkám byl přidán 2 µM MG-132 1 hodinu před infekcí a byl na buňkách přítomen po celou dobu infekce až do fixace 10 a 12 hpi. Po fixaci byly buňky značeny protilátkou na přítomnost LT antigenu metodou nepřímé imunofluorescence. Buňky byly následně pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem (Obr. 4. 10). U buněk, kde probíhala standardní infekce pouze s přítomností DMSO (kontrola) byl 10 i 12 hpi detekován LT antigen. V případě, že byly buňky ošetřeny 2 µM proteazomálním inhibitorem MG-132 po celou dobu infekce, 10 a 12 hpi bylo detekováno mnohem menší množství proteinu LT oproti kontrole.

A) 10 hpi

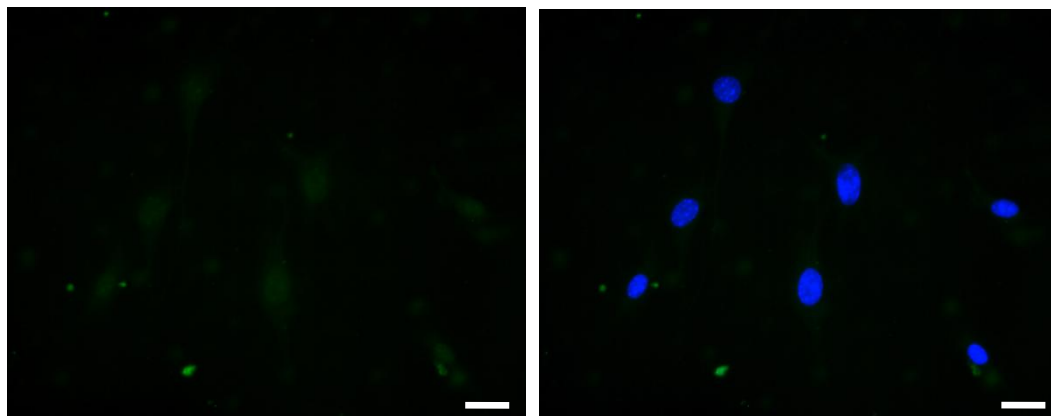


B) 12 hpi





C) NK



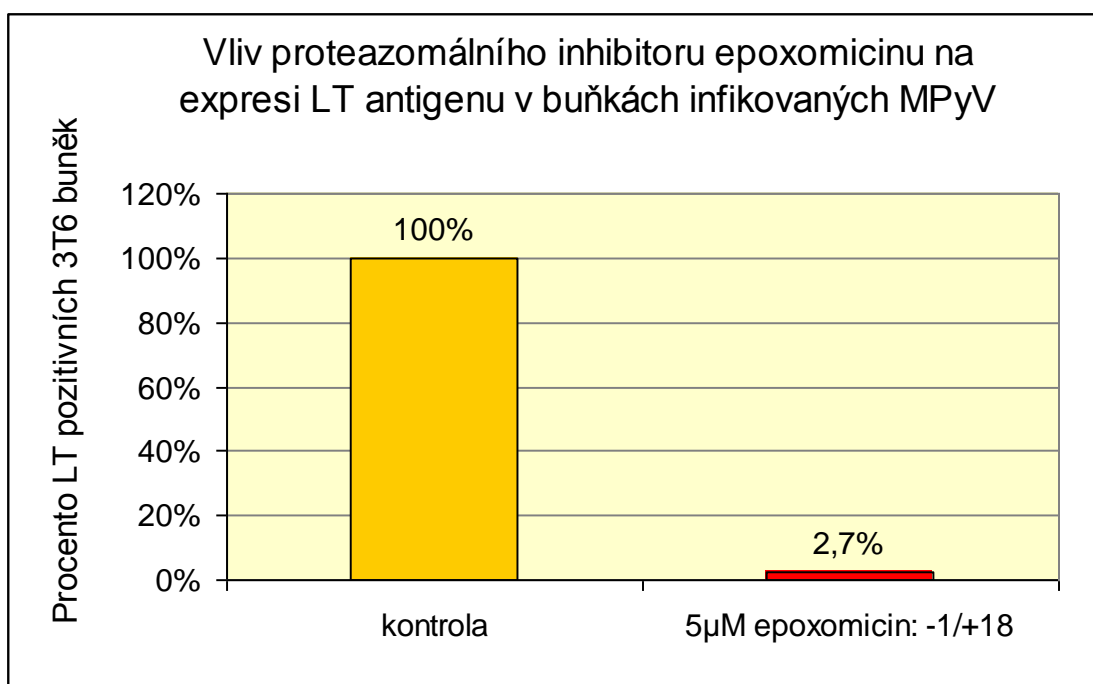
Obr. 4.10: **Detekce LT antigenu MPyV 10 hpi (A) a 12 hpi (B) v kontrolních buňkách ošetřených DMSO (I) a v buňkách ošetřených 2  $\mu$ M inhibítorem proteazómů MG-132 přítomným po celou dobu infekce (II).** C) Negativní kontrola – neinfikované buňky 3T6. V levém sloupci je zobrazen pouze signál ze zeleného kanálu, odpovídající proteinu LT a v pravém sloupci je zobrazen navíc signál z modrého kanálu, odpovídající barvě DAPI, jádrům buněk. V případě buněk ošetřených MG-132, který byl přítomen po celou dobu infekce došlo k poklesu exprese proteinu LT. Byla použita potkaní primární protilátka proti CR T antigenů MPyV a sekundární protilátka proti potkaním imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 488. Úsečka znázorňuje 20  $\mu$ m.

#### 4.3.2 Vliv ireverzibilního inhibitoru epoxomicinu

Rozhodli jsme se otestovat vliv ireverzibilního inhibitoru epoxomicinu na polyomavirovou infekci, konkrétně jsme opět měřili expresi časného LT antigenu pomocí průtokového cytometru. Použít i tento inhibitor, epoxomicin, jsme se rozhodli z důvodu jeho větší specifity vůči proteazómům. Pokus byl proveden na buňkách 3T6 narostlých na Petriho miskách o průměru 6 cm. Synchronizované buňky byly infikovány MPyV s MOI=0,5. Epoxomicin o konečné koncentraci 5  $\mu$ M byl přidán na buňky 1 hod před infekcí a ponechán na buňkách po celou dobu infekce. Buňky byly sklizeny a zafixovány 18 hpi. Dále byly značeny protilátkami na přítomnost LT antigenu a analyzovány průtokovým cytometrem. Výsledky byly zpracovány a jsou shrnuty v Tab. 4.9 a graficky znázorněny na Obr. 4.11. Přítomnost ireverzibilního inhibitoru epoxomicinu na infikovaných buňkách vedla k prudkému poklesu počtu LT pozitivních buněk, konkrétně na 2,7% oproti kontrole, infikovaným buňkám ošetřeným pouze DMSO.

Procento LT pozitivních buněk oproti kontrole (100%) při působení 5 $\mu$ M epoxomicinu	
Čas přidání epoxomicinu/fixace buněk (hod) (0=čas infekce)	-1/+18
1. paralela	3,7%
2. paralela	1,6%
<b>průměr</b>	<b>2,7%</b>

Tab. 4.9: Přehled výsledků pokusu studující vliv 5  $\mu$ M proteazomálního inhibitoru epoxomicinu na expresi proteinu LT MPyV. Expres proteinu LT byla měřena průtokovým cytometrem. V tabulce jsou znázorněny výsledky jednoho pokusu provedeného ve dvou paralelách a konečný výsledek je průměrem těchto dvou paralel. Působení epoxomicinu na infikované buňky již od začátku infekce má za následek prudké snížení procenta LT pozitivních buněk až na 2,7%.

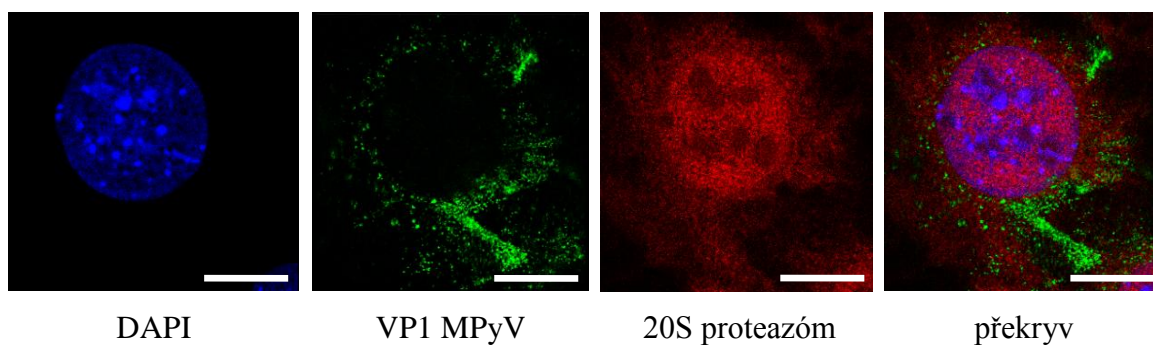


Obr. 4.11: Vliv 5  $\mu$ M inhibitoru proteazómů epoxomicinu přítomného na buňkách od začátku infekce na expresi LT antigenu v buňkách infikovaných MPyV. Grafické znázornění výsledků uvedených v Tab. 4.9. Epoxomicin byl k buňkám přidán 1 hodinu před infekcí a byl zde přítomen až do fixace buněk 18 hpi. Expres LT byla měřena pomocí průtokového cytometru díky spojení sekundární protilátky proti potkaním imunoglobulinům s Alexa fluor 488. Primární protilátka byla použita potkaní proti CR T antigenů MPyV

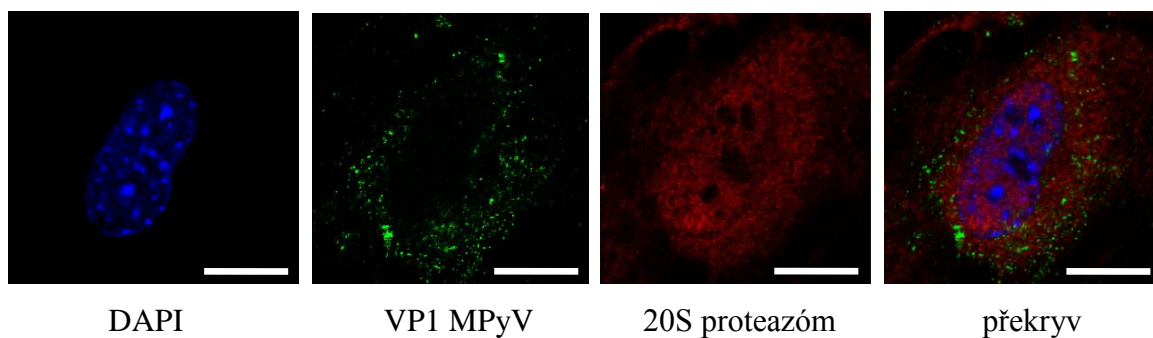
#### 4.4 SLEDOVÁNÍ VZÁJEMNÉ LOKALIZACE PROTEAZÓMŮ A PROTEINU VP1 MPyV A VIRU SV40

Dále nás zajímalo, zda dochází ke kolokalizaci proteinu VP1 polyomavirů a proteazomů v časně fázi infekce. Tento pokus byl proveden s MPyV i virem SV40. Byly provedeny pokusy s 20  $\mu$ M inhibitorem proteazomů MG-132 i bez tohoto inhibitoru, pouze s DMSO. V případě MPyV jsme pracovali s myšími fibroblasty 3T6, které byly nasazeny na mikroskopická sklíčka o průměru 12 mm. Synchronizované buňky byly infikovány MPyV tak, že na jednu buňku připadalo 10 000 všech virových částic (infekčních i neinfekčních). Byla zvolena vysoká multiplicita infekce, protože byly buňky fixovány 4 hpi a v tomto brzkém čase se žádný nový protein VP1 netvoří a tak byly detekovány pouze vstupující virové částice. MG-132 o konečné koncentraci 20  $\mu$ M byl přidán k buňkám 1 hodinu před infekcí a byl na buňkách přítomen až do jejich fixace. 4 hpi byly buňky zafixovány a byly značeny protilátkami proti proteinu VP1 a 20S proteazómu. Takto označené buňky byly pozorovány konfokálním mikroskopem (Obr. 4.12). Získané snímky byly následně analyzovány za účelem zjištění, zda dochází ke kolokalizaci proteinu VP1 s 20S proteazómem. Ukázka nalezených kolokalizací je vyobrazena na Obr. 4.13 A. Analýza snímků i snímky samotné byly provedeny Mgr. Ondřejem Šebestou. Výsledkem analýzy byla kvantifikace kolokalizací (Tab. 4.10). Počet nalezených kolokalizací proteinu VP1 a 20S proteazómu byl mírně vyšší u buněk ošetřených proteazomálním inhibitorem MG-132 oproti buňkám neošetřeným MG-132. V případě buněk neopůsobených MG-132 bylo nalezeno 10,3% kolokalizací zmíněných dvou struktur a u buněk ošetřených MG-132 bylo zjištěno 12,6% kolokalizujících struktur VP1 a proteazomů. Za kolokalizaci zmíněných struktur byla považována situace, kdy byl signál proteazomů nalezen v okolí signálu VP1 v poloměru 125 nm a zároveň poměr jejich intenzit byl větší než 10%. Ukázka výsledků obrazové analýzy je zobrazena na Obr. 4.13. Úplně stejně byl proveden pokus s virem SV40 s tím rozdílem, že byly použity místo myších buněk opičí Vero buňky. Při použití viru SV40 bylo v případě buněk ošetřených pouze DMSO nalezeno 9,2% kolokalizací proteinu VP1 a 20S proteazómu. U buněk infikovaných virem SV40 a opůsobených inhibitorem proteazomů MG-132 bylo zjištěno 13,9% kolokalizací (Tab. 4.10). Ukázka nalezených kolokalizací je vyobrazena na Obr. 4.13 B.

A) DMSO



B) MG-132



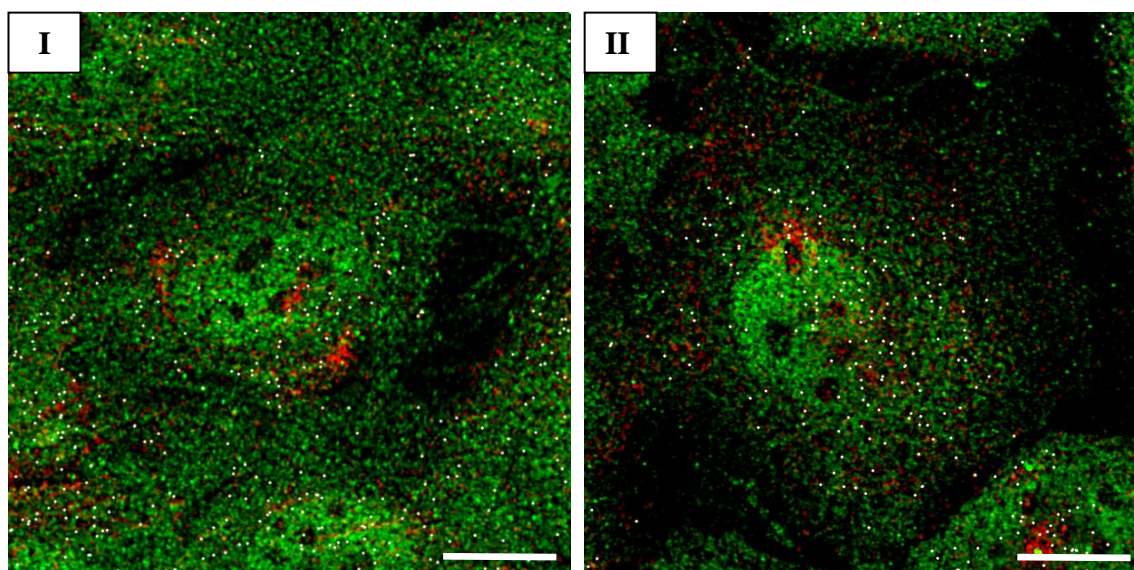
Obr. 4.12: **Ukázka řezů buněk infikovaných MPyV, fixovaných 4 hpi.** Jsou zobrazeny řezy buněk získané konfokálním mikroskopem. A) Řez infikovanou buňkou ošetřenou DMSO (kontrola). B) Řez infikovanou buňkou opůsobenou 20  $\mu$ M inhibitorem proteazómů MG-132. Byla použita myší primární protilátka proti proteinu VP1 a králičí primární protilátka proti 20S proteazómu. Sekundární protilátka byla použita oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 488 a dále kozí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 546. Snímky byly pořízeny Mgr. Ondřejem Šebestou. Úsečka znázorňuje 10  $\mu$ m.

	<b>Procento nalezených kolokalizací mezi virovým proteinem VP1 a 20S proteazómem</b>	
	Buňky ošetřené DMSO	Buňky ošetřené MG-132
<b>MPyV</b>	10,3%	12,6%
<b>Virus SV40</b>	9,2%	13,9%

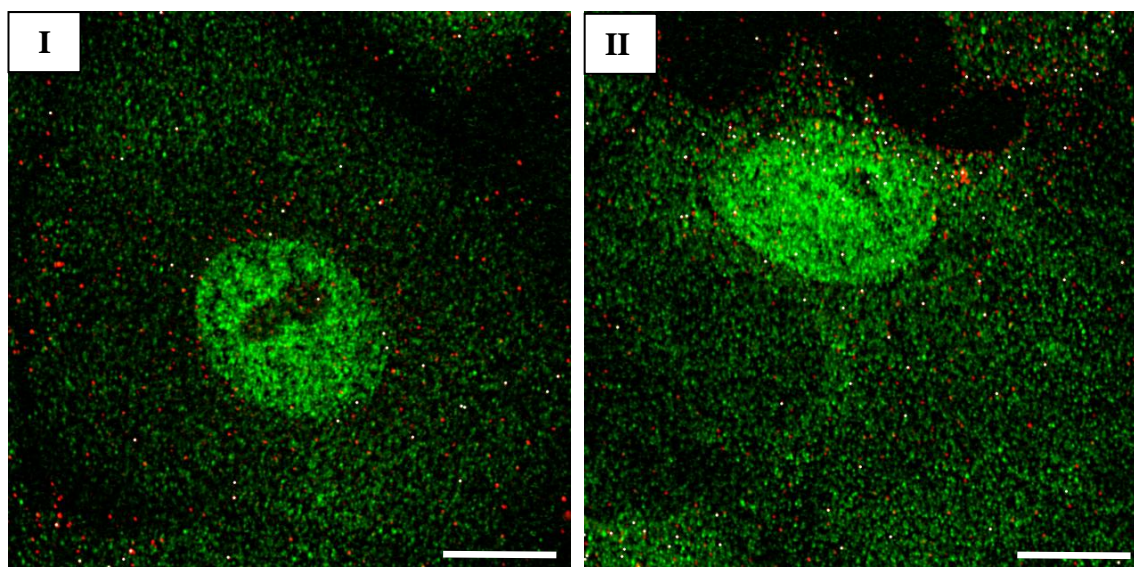
Tab. 4.10: **Výsledky analýzy kolokalizujících struktur virového proteinu VP1 MPyV a viru SV40 s 20S proteazómem 4 hpi.** Byly provedeny pokusy s buňkami ošetřenými pouze DMSO a také s buňkami ošetřenými proteazomálním inhibitorem MG-132. Za kolokalizaci proteinu VP1 a 20S proteazómu byla považována situace, kdy byl signál proteazómů nalezen v okolí signálu VP1 v poloměru 125 nm a zároveň poměr jejich intenzit byl větší než 10%. Kvantifikace byla provedena analýzou 15 buněk.



#### A) MPyV



#### B) SV40



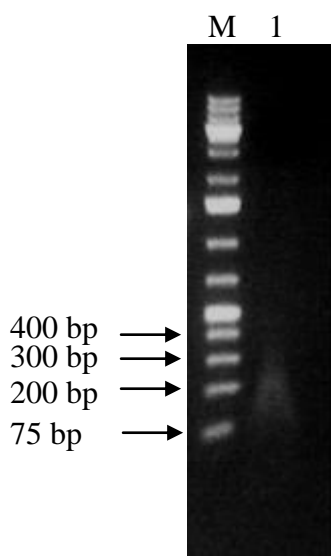
Obr. 4.13: Ukázka nalezených kolokalizací mezi virovým proteinem VP1 MPyV (A) a viru SV40 (B) s 20S proteazómem 4 hpi. I – buňky ošetřené DMSO, II – buňky ošetřené proteazomálním inhibitorem MG-132. Zeleně jsou znázorněny proteazómy, červeně hlavní virový kapsidový protein VP1 a bíle jsou označeny nalezené kolokalizace. Na obrázku jsou zobrazeny snímky z konfokálního mikroskopu. A) Byla použita myší primární protilátka proti proteinu VP1 MPyV a králičí primární protilátka proti 20S proteazómu. Sekundární protilátka byla použita oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 546 a kozí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 488. B) Byla použita králičí primární protilátka proti proteinu VP1 SV40 a myší primární protilátka proti 20S proteazómu.

Sekundární protilátka byla použita oslí proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 488 a dále kozí proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 546. Snímky byly pořízeny Mgr. Ondřejem Šebestou. Úsečka znázorňuje 10  $\mu\text{m}$ .

## 4.5 DETEKCE VIROVÉ DNA V PŘÍTOMNOSTI INHIBITORU PROTEAZÓMŮ MG-132

Dále jsme se rozhodli sledovat virovou DNA u buněk ošetřených inhibitorem proteazómů MG-132. Zajímalo nás, zda bude například docházet ke zpoždění nástupu replikace virové DNA v přítomnosti MG-132 nebo zda k replikaci virové DNA vůbec bude docházet. Pokud by například proteazómy hrály roli při nutném rozvolňování virionu, v případě proteazomální inhibice by nemuselo dojít k dopravě DNA do jádra a tím pádem bychom nebyli schopni detekovat virovou replikující se DNA v jádře. Detekce virové DNA byla provedena metodou fluorescenční *in situ* hybridizace.

Nejprve bylo potřeba připravit sondu proti DNA MPyV. Sonda byla připravena z plazmidu pMJG, který obsahuje celý genom MPyV. Sonda byla připravena pomocí kitu BioNick<sup>TM</sup> Labeling System (Invitrogen) (kapitola 3.2.6.1). Na přípravu sondy bylo použito 1,5 µg DNA, plazmidu pMJG. Výsledkem byla sonda o velikosti cca 230 bp (Obr. 4.14).

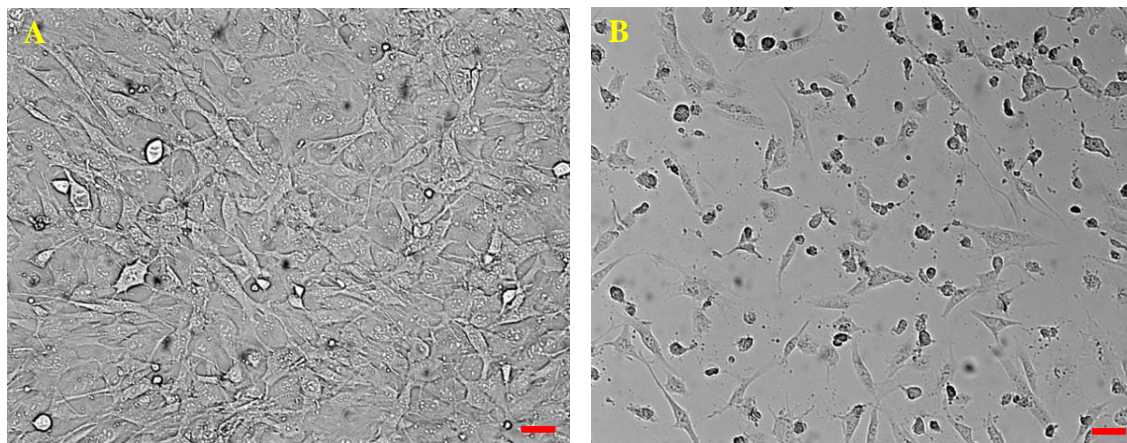


Obr. 4.14: Agarózová elektroforéza DNA sondy proti genomu MPyV. M – marker. Dráha č. 1 – DNA sonda proti genomu MPyV vytvořená z plazmidu pMJG obsahující celý genom MPyV pomocí kitu BioNick<sup>TM</sup> Labeling System (Invitrogen).

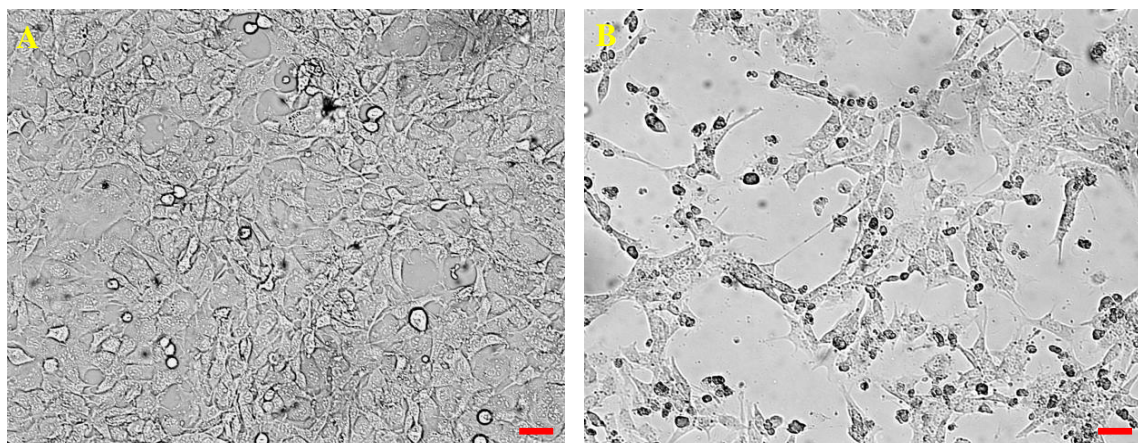
Nejprve byl proveden pokus s buňkami 3T6 narostlými na mikroskopických sklíčkách o průměru 12 mm. Synchronizované buňky byly infikovány MPyV s MOI=10. Proteazomální inhibitor MG-132 o konečné koncentraci 20 µM byl přidán k buňkám jednu hodinu před infekcí a byl na buňkách přítomen po celou dobu infekce.



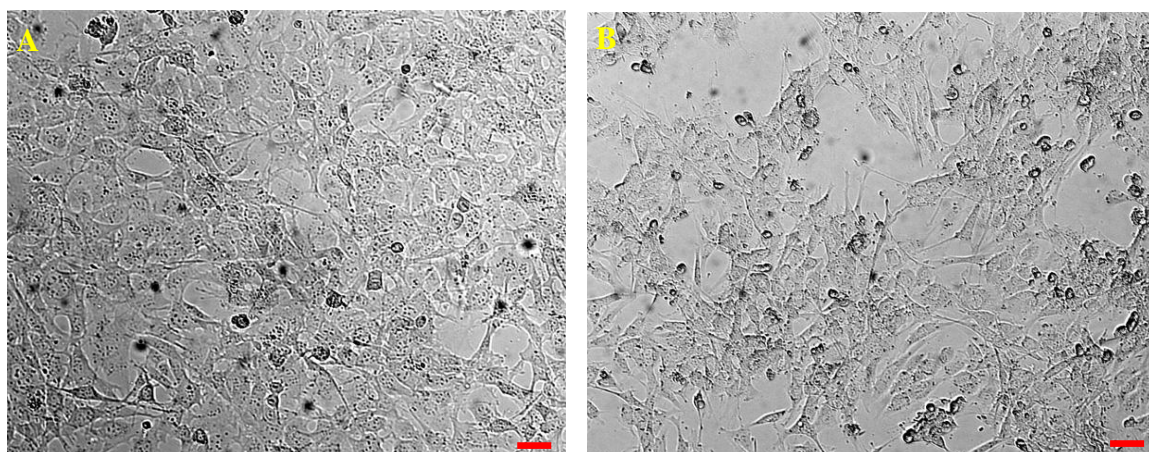
Buňky byly fixovány 24 hpi. Bohužel byla zjištěna cytotoxicita 20  $\mu$ M MG-132 přítomného na buňkách 25 hodin. Vyvolaná cytotoxicita byla vidět pod mikroskopem pouhým okem, mnoho buněk bylo mrtvých (Obr. 4.15). Následně jsme vyzkoušeli cytotoxicitu nižších koncentrací MG-132, 5  $\mu$ M a 2  $\mu$ M. Pokud byl 5  $\mu$ M MG-132 přítomen na buňkách 25 hodin, také způsobil cytotoxicitu buněk viditelnou okem (Obr. 4.16). MG-132 o konečné koncentraci 2  $\mu$ M přítomen na buňkách 25 hod již cytotoxicitu nezpůsobil (Obr. 4.17). Následné pokusy byly tedy prováděny již s 2  $\mu$ M MG-132.



Obr. 4.15: **Cytotoxicita způsobená 20  $\mu$ M MG-132 přítomným 25 hod.** A) kontrolní buňky 3T6 infikované MPyV ošetřené DMSO. B) Buňky 3T6 infikované MPyV ošetřené 20  $\mu$ M MG-132 přítomným 25 hod. Takto působící MG-132 zapříčinil vysokou úmrtnost buněk. V obou případech bylo před infekcí nasazeno stejné množství buněk. Úsečka znázorňuje 20  $\mu$ m.



Obr. 4.16: **Cytotoxicita způsobená 5 µM MG-132 přítomným 25 hod.** A) kontrolní buňky 3T6 infikované MPyV ošetřené DMSO. B) Buňky 3T6 infikované MPyV ošetřené 5 µM MG-132 přítomným 25 hod. Takto působící MG-132 zapříčinil úmrtnost buněk. V obou případech bylo před infekcí nasazeno stejné množství buněk. Úsečka znázorňuje 20 µm.

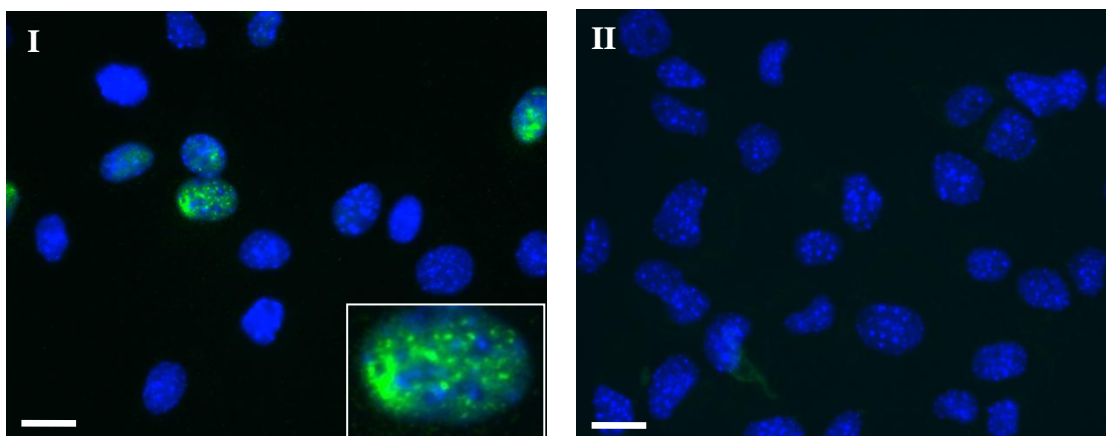


Obr. 4.17: **Vliv 2 µM MG-132 přítomného 25 hod na buňkách 3T6.** A) kontrolní buňky 3T6 infikované MPyV ošetřené DMSO. B) Buňky 3T6 infikované MPyV ošetřené 2 µM MG-132 přítomným 25 hod. Takto působící MG-132 nezapříčinil vysokou úmrtnost buněk. Nižší počet buněk na Obr. B je v tomto případě s velkou pravděpodobností zapříčiněn negativním vlivem MG-132 na replikaci DNA. V obou případech bylo před infekcí nasazeno stejné množství buněk. Úsečka znázorňuje 20 µm.

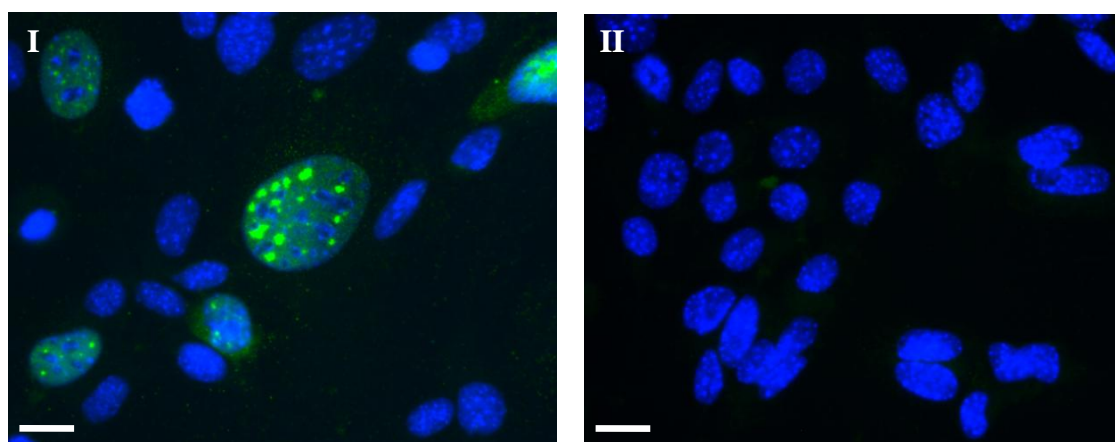
Následně byl proveden pokus s 3T6 buňkami narostlými na mikroskopických sklíčkách o průměru 12 mm. Synchronizované buňky byly infikovány MPyV s MOI=10. MG-132 o konečné koncentraci 2  $\mu$ M byl přidán k buňkám 1 hodinu před infekcí a byl přítomen po celou dobu infekce až do fixace. Replikující se DNA se nám podařilo detekovat v buňkách metodou FISH nejdříve 14 hpi a 16 hpi jsme detekovali již plně rozvinutou replikaci virové DNA. Buňky byly proto fixovány 16 a 24 hpi. Buňky byly následně značeny na přítomnost virové DNA metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (kapitola 3.2.6.2). Sonda proti genomu MPyV byla konjugována s biotinem a ten byl následně značen metodou nepřímé imunofluorescence. Označené buňky byly pozorovány fluorescenčním mikroskopem (Obr. 4.18). V časech 16 i 24 hpi byla u kontrolních buněk ošetřených DMSO detekována virová DNA. Ovšem u buněk ošetřených 2  $\mu$ M proteazomálním inhibitorem MG-132 nebyla 16 a 24 hpi detekována žádná virová DNA.



A) 16 hpi



B) 24 hpi

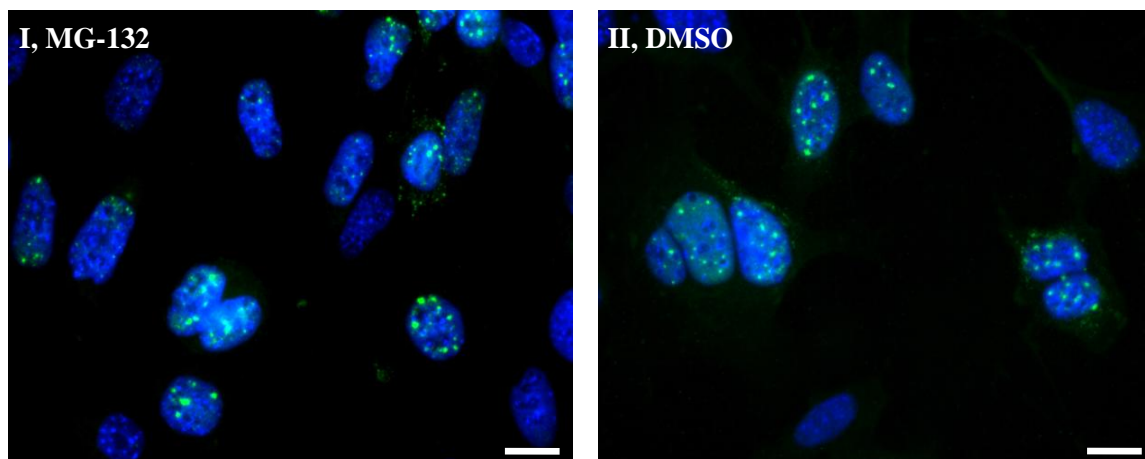


**Obr. 4.18: Detekce virové DNA MPyV v přítomnosti 2  $\mu$ M proteazomálního inhibitoru MG-132 přítomného na buňkách po celou dobu infekce.** A) Buňky 3T6 infikované MPyV fixované 16 hpi. B) Buňky 3T6 infikované MPyV fixované 24 hpi. I – kontrolní buňky ošetřené pouze DMSO. II – buňky ošetřené 2  $\mu$ M MG-132 přítomným po celou dobu infekce, v tomto případě nebyla detekována žádná virová DNA (pozorováno cca 1000 buněk). Na detekci virové DNA byla použita metoda FISH. Biotinylovaná DNA sonda proti genomu MPyV byla barvena králičí primární protilátkou proti biotinu a dále byla použita sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 488. Úsečka znázorňuje 10  $\mu$ m.

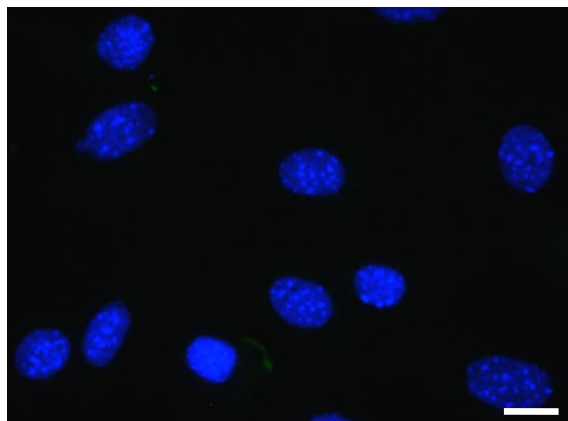
Dále jsme se zaměřili na bližší určení fáze infekčního cyklu MPyV, ve které dochází k ovlivnění proteazomálním inhibitorem MG-132 s důsledkem neschopnosti detekce virové DNA. Byl proveden pokus s 3T6 fibroblasty narostlými na mikroskopických sklech o průměru 12 mm. Synchronizované buňky byly infikovány MPyV.

MG-132 o konečné koncentraci 2  $\mu$ M byl k buňkám přidán až 12 hpi a byl přítomen až do fixace buněk 24 hpi. Buňky byly dále značeny na přítomnost virové DNA metodou FISH. V případě přítomnosti MG-132 od 12 hpi do času fixace 24 hpi jsme virovou DNA detekovali (Obr. 4.19). Abychom ověřili, že 12 hpi nelze ještě detekovat virovou DNA, značili jsme v tomto čase infikované buňky bez MG-132 (Obr. 4.19).

A) fixováno 24 hpi, +12/+24 hpi MG-132, DMSO



B) fixováno 12 hpi, žádný MG-132

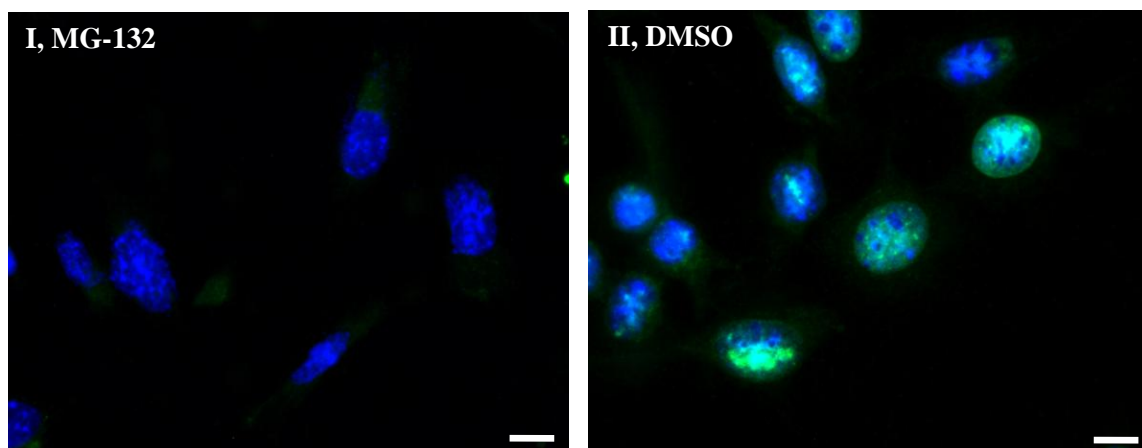


Obr. 4.19: **Detekce virové DNA MPyV v přítomnosti 2  $\mu$ M proteazomálního inhibitoru MG-132 přítomného na buňkách od 12 hpi do 24 hpi.** A) Buňky 3T6 infikované MPyV fixované 24 hpi. I – MG-132 byl přidán 12 hpi a byl přítomen až do fixace buněk 24 hpi. V tomto případě byla detekována virová DNA. II – kontrolní buňky ošetřené pouze DMSO. B) Buňky 3T6 infikované MPyV, fixované 12 hpi. V takto brzkém čase ještě nelze detekovat DNA MPyV. Virové DNA byla detekována metodou FISH. Biotinylovaná DNA sonda proti genomu MPyV byla barvena králičí primární protilátkou proti biotinu a dále byla použita sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 488. Úsečka znázorňuje 10  $\mu$ m.

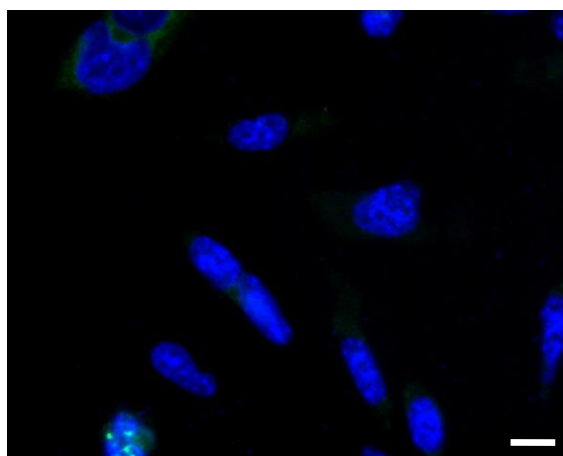
Z předchozích výsledků jsme věděli, že pokud je 2  $\mu$ M MG-132 přítomný na buňkách 3T6 po celou dobu infekce MPyV, nejsme schopni detekovat žádnou virovou DNA. Pokud MG-132 přidáme až 12 hpi a necháme ho na buňkách až do doby fixace buněk 24 hpi, detekovat virovou DNA schopni jsme.

Proto jsme se dále rozhodli zaměřit se na prvních 12 hodin infekce a blíže určit v jaké fázi z intervalu 0 - 12 hpi dochází k ovlivnění infekce MPyV proteazomálním inhibitorem MG-132. Byl tedy proveden pokus s buňkami 3T6 narostlými na mikroskopických sklech o průměru 12 mm. Synchronizované buňky byly infikovány MPyV. MG-132 o konečné koncentraci 2  $\mu$ M byl k buňkám přidán 1 hodinu před infekcí a odmyt 24 hpi (negativní kontrola), dále byl MG-132 přidán 2, 4, 6, 8 a 10 hpi a ve všech případech byl na buněčné kultuře přítomen až do fixace buněk 24 hpi. Následně byly buňky značeny na přítomnost virové DNA metodou FISH (Obr. 4.20). Množství buněk obsahující virovou DNA bylo kvantifikováno (Tab. 4.11). Pokud byl MG-132 přítomen na buňkách od 2 hpi do 24 hpi, detekovali jsme minimální množství buněk s virovou DNA (2,7%). Postupně se zkracujícím se intervalem přítomnosti MG-132 na buňkách (+4/+24, +6/+24, +8/+24, +10/+24) docházelo k nálezům čím dál většího množství buněk s replikující se DNA (12,9%; 34,8%; 49,2%; 52,3%).

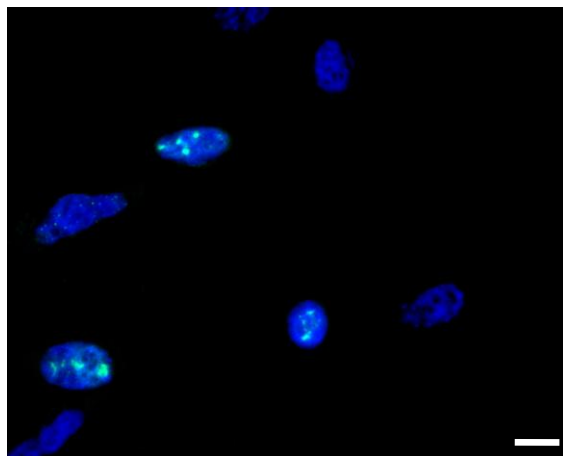
A) fixováno 24 hpi, -1/+24 MG-132 (I), DMSO (II)



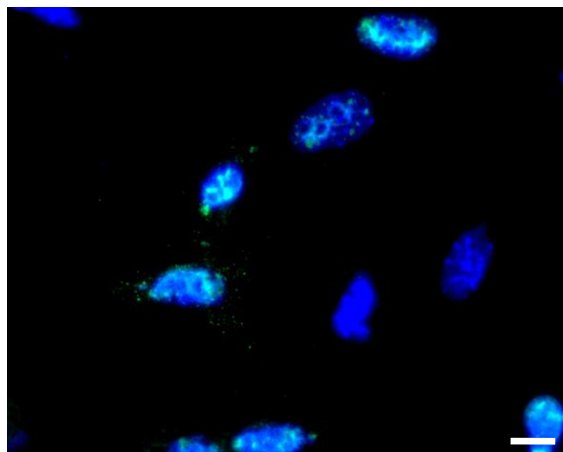
B) fixováno 24 hpi, +2/+24 MG-132



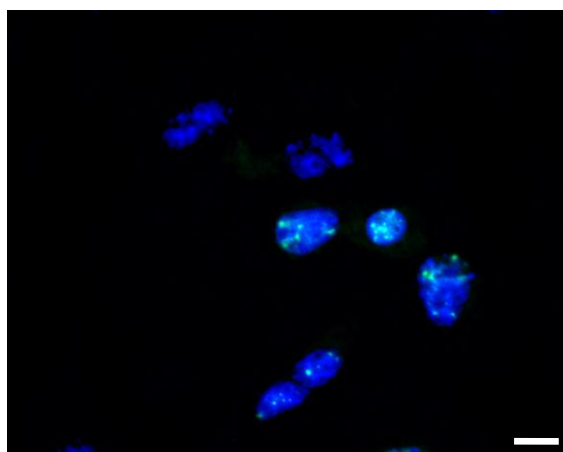
C) fixováno 24 hpi, +4/+24 MG-132



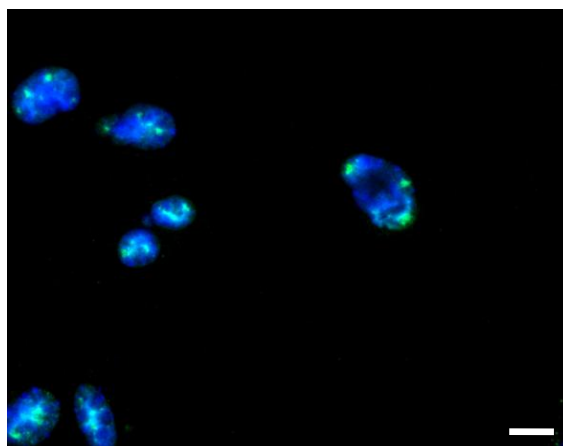
D) fixováno 24 hpi, +6/+24 MG-132



E) fixováno 24 hpi, +8/+24 MG-132



F) fixováno 24 hpi, +10/+24 MG-132



Obr. 4.20: **Detekce virové DNA MPyV v přítomnosti 2  $\mu$ M proteazomálního inhibitoru MG-132 přítomného na buňkách po různě dlouhou dobu.** Ve všech případech byly buňky 3T6 infikované MPyV fixované 24 hpi. A) I – inhibitor proteazómů MG-132 byl přidán 1 hodinu před infekcí a byl přítomen na buňkách po celou dobu infekce až do fixace 24 hpi. II – kontrolní buňky ošetřené pouze DMSO. B) – F) Buňky infikované MPyV ošetřené MG-132, který byl přidán v čase 2 hpi (B), 4 hpi (C), 6 hpi (D), 8 hpi (E) a 10 hpi (10) a byl přítomen na buňkách až do jejich fixace. Virové DNA byla detekována metodou FISH. Biotinylovaná DNA sonda proti genomu MPyV byla barvena králičí primární protilátkou proti biotinu a dále byla použita sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 488. Úsečka znázorňuje 10  $\mu$ m.



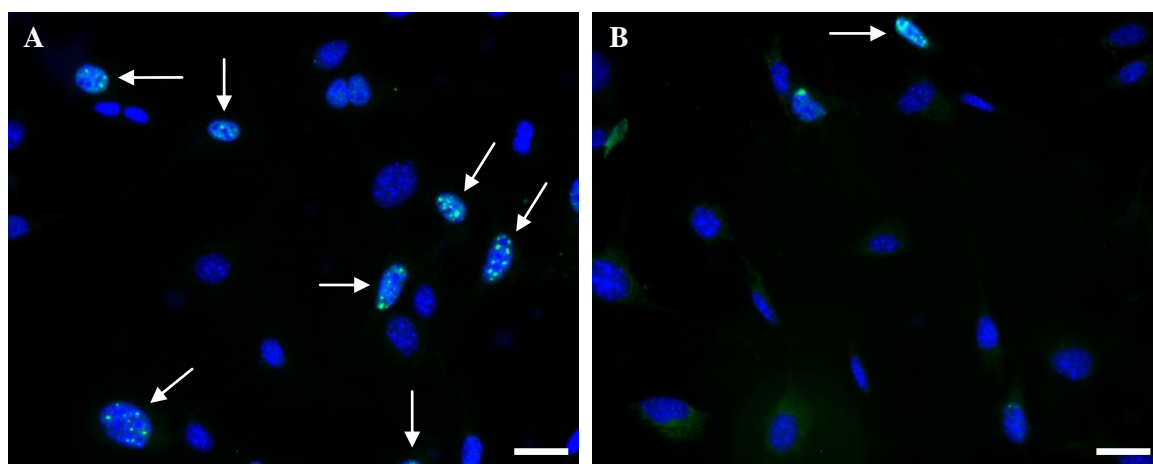
Čas přidání 2 $\mu$ M MG-132/čas fixace (0=čas infekce)	Procento buněk obsahující virovou DNA
-1/+24	0,1%
+2/+24	2,7%
+4/+24	12,9%
+6/+24	34,8%
+8/+24	49,2%
+10/+24	52,3%

pouze DMSO (pozitivní kontrola)	73,5%
---------------------------------	-------

Tab. 4.11: **Detekce virové DNA MPyV v přítomnosti 2  $\mu$ M proteazomálního inhibitoru MG-132 přítomného na buňkách po různě dlouhou dobu - kvantifikace dat, jejichž ukázky jsou zobrazeny na Obr. 4.20.** Každá hodnota je průměrem z cca 900 pozorovaných buněk.

Dále byl proveden pokus s myšími fibroblasty 3T6 narostlými na mikroskopických sklech o průměru 12 mm. Synchronizované buňky byly infikovány MPyV. MG-132 o konečné koncentraci 2  $\mu$ M byl k buňkám přidán jednu hodinu před infekcí a byl odmyt 12 hpi. Buňky byly fixovány 24 hpi a následně byla detekována virová DNA metodou fluorescenční *in situ* hybridizace. V případě působení MG-132 prvních 12 hodin infekce jsme detekovali minimální množství virové DNA (Obr. 4.21).

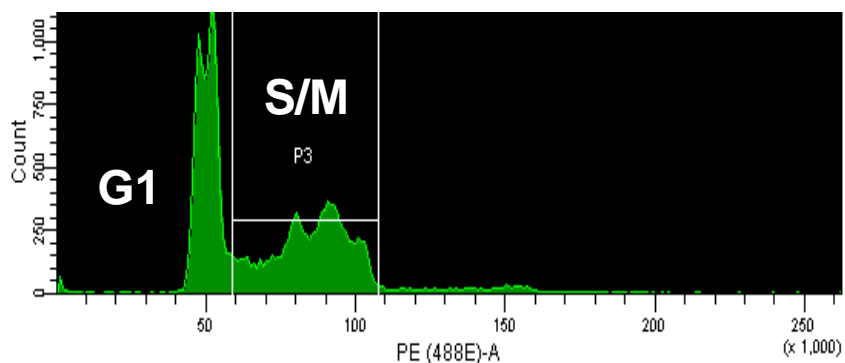


Obr. 4.21: **Detekce virové DNA 24 hpi v přítomnosti 2  $\mu$ M proteazomálního inhibitoru MG-132 prvních 12 hodin infekce MPyV.** Buňky 3T6 byly fixovány 24 hpi. A) Kontrolní buňky ošetřené pouze DMSO. B) Buňky ošetřené MG-132 prvních 12 hodin infekce. Virová DNA byla detekována metodou FISH. Biotinylovaná DNA sonda proti genomu MPyV byla barvena králičí primární protilátkou proti biotinu a dále byla použita sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 488. Úsečka znázorňuje 20  $\mu$ m.

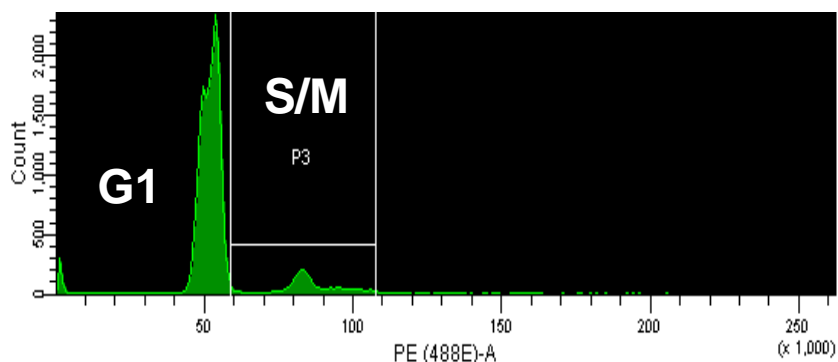
## 4.6 VLIV PROTEAZOMÁLNÍHO INHIBITORU MG-132 NA MNOŽSTVÍ BUNĚČNÉ A VIROVÉ DNA

V předešlých experimentech popsaných v kapitole 4.5 jsme zjistili, že pokud je na buňkách infikovaných MPyV přítomný 2  $\mu$ M proteazomální inhibitor MG-132 po celou dobu infekce trvající 16 nebo 24 hod, nejsme schopni detekovat v jádrech buněk žádnou virovou DNA (Obr. 4.18). Jedním z možných vysvětlení tohoto jevu by mohlo být ovlivnění replikace DNA inhibitorem proteazómů MG-132. Pro objasnění tohoto efektu byl proveden pokus s buňkami 3T6 narostlými na Petriho miskách o průměru 6 cm. Některé synchronizované buňky byly infikovány MPyV s MOI=5. Proteazomální inhibitor MG-132 o konečné koncentraci 2  $\mu$ M byl přidán k buňkám 1 hodinu před infekcí a byl na buňkách přítomen až do fixace buněk 24 hpi. MG-132 (2  $\mu$ M) byl přidán také k neinfikovaným buňkám a byl zde přítomen 25 hod. Buňky byly fixovány 24 hpi a 25 hod po přidání MG-132 a DNA byla značena pomocí propidium jodidu (kapitola 3.2.3.3). Takto označené buňky byly následně analyzovány pomocí průtokového cytometru (Obr. 4.22). Výsledky tohoto pokusu byly seříděny do Tab. 4.12. Co se týká buněk ošetřených pouze DMSO, u infikovaného vzorku se vyskytovalo větší procento buněk obsahující více DNA než 2n oproti neinfikovaným buňkám (Obr. 4.22 A a C). Vždy u vzorků, kde byl přítomen 2  $\mu$ M inhibitor proteazómů MG-132 se vyskytovalo menší procento buněk s množstvím DNA > 2n než u kontrolních buněk bez MG-132, u neinfikovaných buněk došlo k poklesu ze 44,3% na 12,3% buněk v S/M fázi a u infikovaných buněk se vyskytl pokles procenta buněk s množstvím DNA > 2n z 57,2% na 12,4% v přítomnosti MG-132 (Obr. 4.22 B a D).

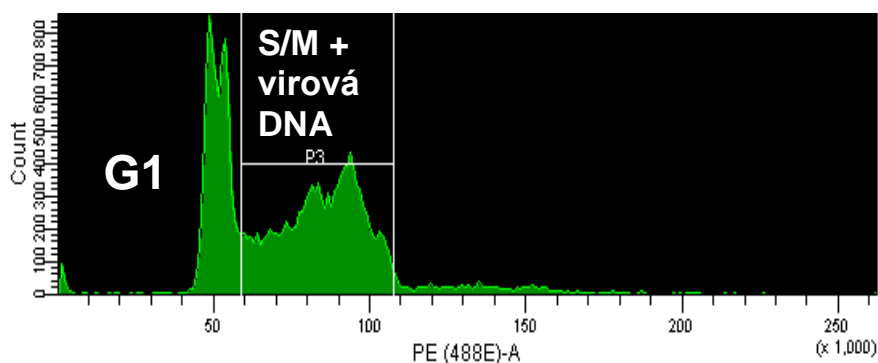
A) neinfikované buňky bez inhibitoru proteazómů (44,3% buněk v S/M-fázi)



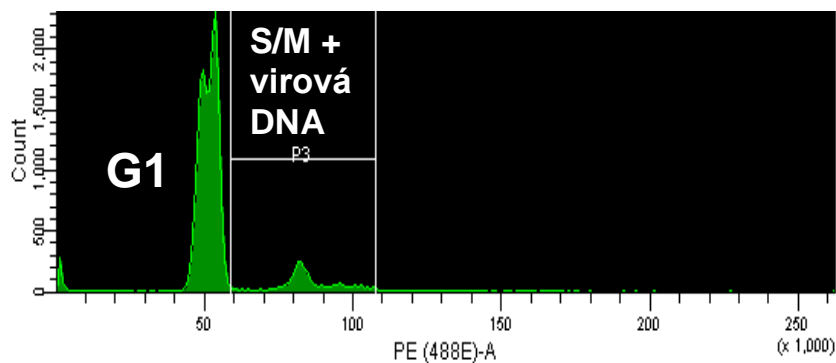
B) neinfikované buňky s inhibitorem proteazómů (13,2% buněk v S/M-fázi)



C) infikované buňky bez inhibitoru proteazómů (57,2% buněk s množstvím DNA > 2n)



D) infikované buňky s inhibitorem proteazómů (12,4% buněk s množstvím DNA > 2n)



Obr. 4.22: **Měření obsahu DNA u buněk neinfikovaných i infikovaných MPyV s 25 hodinovou přítomností 2  $\mu$ M proteazomálního inhibitoru MG-132, který byl přidán 1 hod před infekcí a ponechán na buňkách až do jejich fixace.** Na obrázku jsou znázorněny histogramy získané analýzou dat z průtokového cytometru. Na ose x je znázorněna intenzita fluorescence propidium jodidu (množství DNA) a osa y ukazuje počet buněk. G1=G1 fáze buněčného cyklu. S/M=S až M fáze buněčného cyklu. A) Neinfikované buňky bez inhibitoru proteazómů MG-132. Zde bylo detekováno 44,3% buněk v S/M fázi. B) Neinfikované buňky s 2  $\mu$ M inhibitorem proteazómů MG-132 přítomným 25 hod. Zde pokleslo procento buněk v S/M fázi na 13,2%. C) Infikované buňky bez MG-132. V tomto případě se vyskytovalo 57,2% buněk s množstvím DNA > 2n. D) Infikované buňky s 2  $\mu$ M MG-132 přidáním 1 hod před infekcí a přítomným až do fixace buněk 24 hpi. Zde kleslo procento buněk s množstvím DNA > 2n na 12,4%. DNA byla zviditelněna propidium jodidem a následně měřena pomocí průtokového cytometru.

	Procento buněk obsahující množství DNA > 2n		
	1. paralela	2. paralela	průměr
<b><u>neinfikované buňky bez</u> MG-132</b>	40,6%	47,9%	<b>44,3%</b>
<b><u>neinfikované buňky s</u> MG-132</b>	13,9%	12,5%	<b>13,2%</b>
<b><u>infikované buňky bez</u> MG-132</b>	56,4%	57,9%	<b>57,2%</b>
<b><u>infikované buňky s</u> MG-132</b>	13,7%	11,1%	<b>12,4%</b>

Tab. 4.12: **Přehled výsledků pokusu studující vliv 2  $\mu$ M inhibitoru proteazómů MG-132 na množství buněčné a virové DNA.** V této tabulce jsou shrnuty výsledky zobrazené na Obr. 4.22. Pokus byl proveden s dvěma paralelami a konečný výsledek je průměrem těchto dvou paralel.

Výsledky shrnuté v Tab. 4.11 nás inspirovaly k myšlence, zda je množství DNA v buňce přímo závislé na délce působení proteazomálního inhibitoru MG-132. Byl tedy proveden pokus s myšími fibroblasty 3T6 narostlými na Petriho miskách o průměru 6 cm. Synchronizované buňky byly infikovány MPyV. Proteazomální inhibitor MG-132 o konečné koncentraci 2  $\mu$ M byl přidán k buňkám 1 hodinu před infekcí, 2 hpi, 4 hpi, 6 hpi, 8 hpi, 10 hpi a 12 hpi.

Ve všech případech byl přítomen MG-132 po celou dobu infekce až do fixace buněk 24 hpi. Po fixaci buněk byla značena DNA pomocí propidium jodidu. Takto označené buňky byly analyzovány průtokovým cytometrem. Výsledky měření jsou zobrazeny v Tab. 4.13. Ze získaných výsledků byl sestrojen graf (Obr. 4.23). U neinfikovaných buněk se vyskytovalo v S/M fázi buněčného cyklu 47,6% buněk. U infikovaných buněk bez MG-132 bylo detekováno 67,7% buněk s DNA>2n. Pokud byl inhibitor proteazómů MG-132 přítomen na infikovaných buňkách po celou dobu infekce, kleslo procento buněk s DNA>2n na 33,1%. Dále se ukázalo, že čím kratší dobu je MG-132 přítomen na infikovaných buňkách, tím více buněk s DNA>2n detekujeme. V případě, kdy byl MG-132 přidán až 12 hpi a byl na buňkách přítomen do doby fixace 24 hpi, detekovali jsme 67,1% buněk s DNA>2n, což je přibližně stejná hodnota jako u infikovaných buněk ošetřených pouze DMSO.

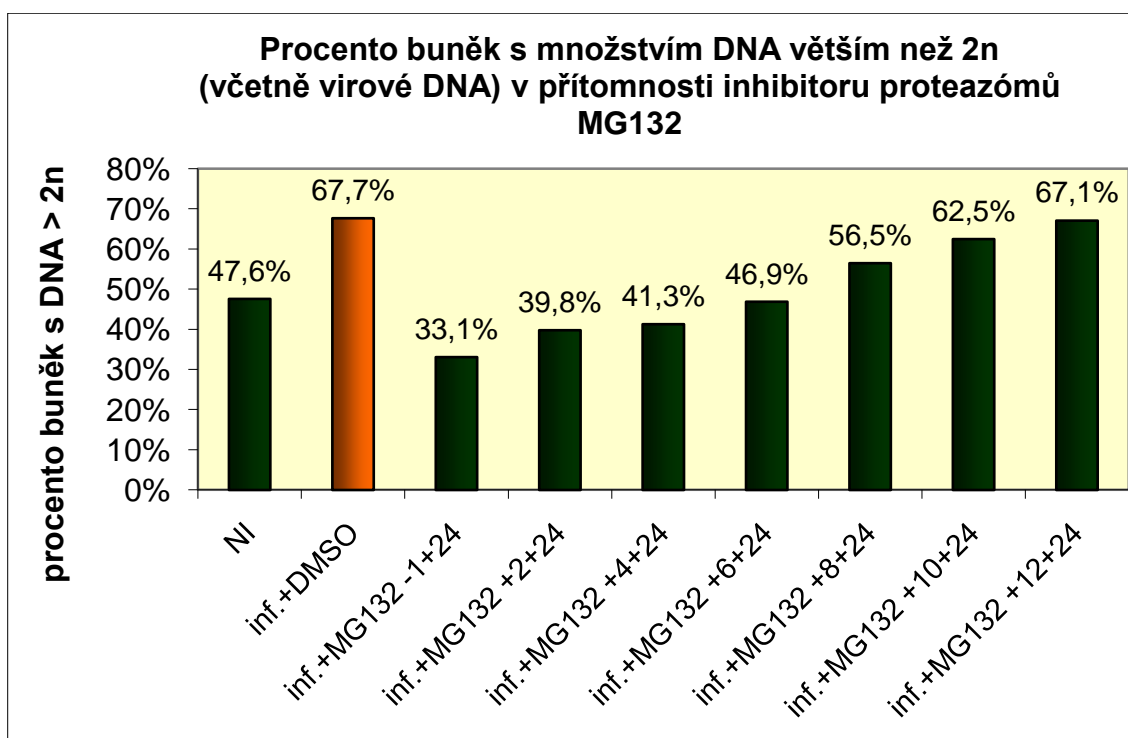
A)

<b>Procento buněk s množstvím DNA větším než 2n (včetně virové DNA) v přítomnosti 2 <math>\mu</math>M proteazomálního inhibitoru MG-132</b>							
<b>Čas přidání/odmytí MG-132 (hod) (0=čas infekce)</b>	-1/24	+2/+24	+4/+24	+6/+24	+8/+24	+10/+24	+12/+24
1. paralela	33,3%	40,9%	39,4%	44,4%	55,0%	57,3%	67,1%
2. paralela	32,9%	38,7%	43,1%	49,4%	58,0%	67,7%	nedetekováno
<b>průměr</b>	<b>33,1%</b>	<b>39,8%</b>	<b>41,3%</b>	<b>46,9%</b>	<b>56,5%</b>	<b>62,5%</b>	<b>67,1%</b>

B)

<b>Procento buněk s množstvím DNA větším než 2n (včetně virové DNA)</b>		
	Neinfikované buňky	Infikované buňky + DMSO
1. paralela	51,4%	56,3%
2. paralela	43,8%	79,0%
<b>průměr</b>	<b>47,6%</b>	<b>67,7%</b>

Tab. 4.13: Souhrn výsledků pokusu sledující vliv 2  $\mu$ M proteazomálního inhibitoru MG-132 přítomného na buňkách různě dlouhou dobu na množství DNA v buňkách infikovaných MPyV (A). V tab. B jsou znázorněny kontroly, procento buněk s množstvím DNA větším než 2n u neinfikovaných buněk (47,6%) a u buněk infikovaných MPyV ošetřených pouze DMSO (67,7%). Pokud byl MG-131 přítomen na buňkách celou dobu infekce, kleslo procento buněk s DNA>2n na 33,1%. Pokud byl MG-132 přidán 2 hpi a ponechán do fixace buněk 24 hpi, vyskytovalo se ve vzorku 39,8% buněk s DNA>2n. V případě působení MG-132 od 4 hpi do doby fixace buněk 24 hpi bylo detekováno 41,3% buněk s DNA>2n. Pokud byl MG-132 přidán 6 hpi a byl na buňkách až do jejich fixace 24 hpi, vyskytovalo se ve vzorku 46,9% buněk s DNA>2n. V případě působení MG-132 v čase +8 až +24 hpi bylo detekováno 56,5% buněk s DNA>2n. Toto procento dosáhlo hodnoty 62,5 při působení MG-132 od 10 hpi do 24 hpi. A konečně 67,1% buněk s DNA>2n se vyskytlo u vzorku, kde byl MG-132 přidán 12 hpi a zůstal na buňkách do jejich fixace 24 hpi. Pokus byl proveden s dvěma paralelami a konečný výsledek je průměrem těchto dvou paralel. DNA byla zviditelněna propidium jodidem a následně měřena pomocí průtokového cytometru.



Obr. 4.23: Vliv 2  $\mu$ M proteazomálního inhibitoru MG-132 přítomného na buňkách různě dlouhou dobu na množství DNA v buňkách infikovaných MPyV. Grafické znázornění výsledků uvedených v Tab. 4.13. NI=neinfikované buňky. Inf=buňky infikované MPyV. 0=čas infekce.



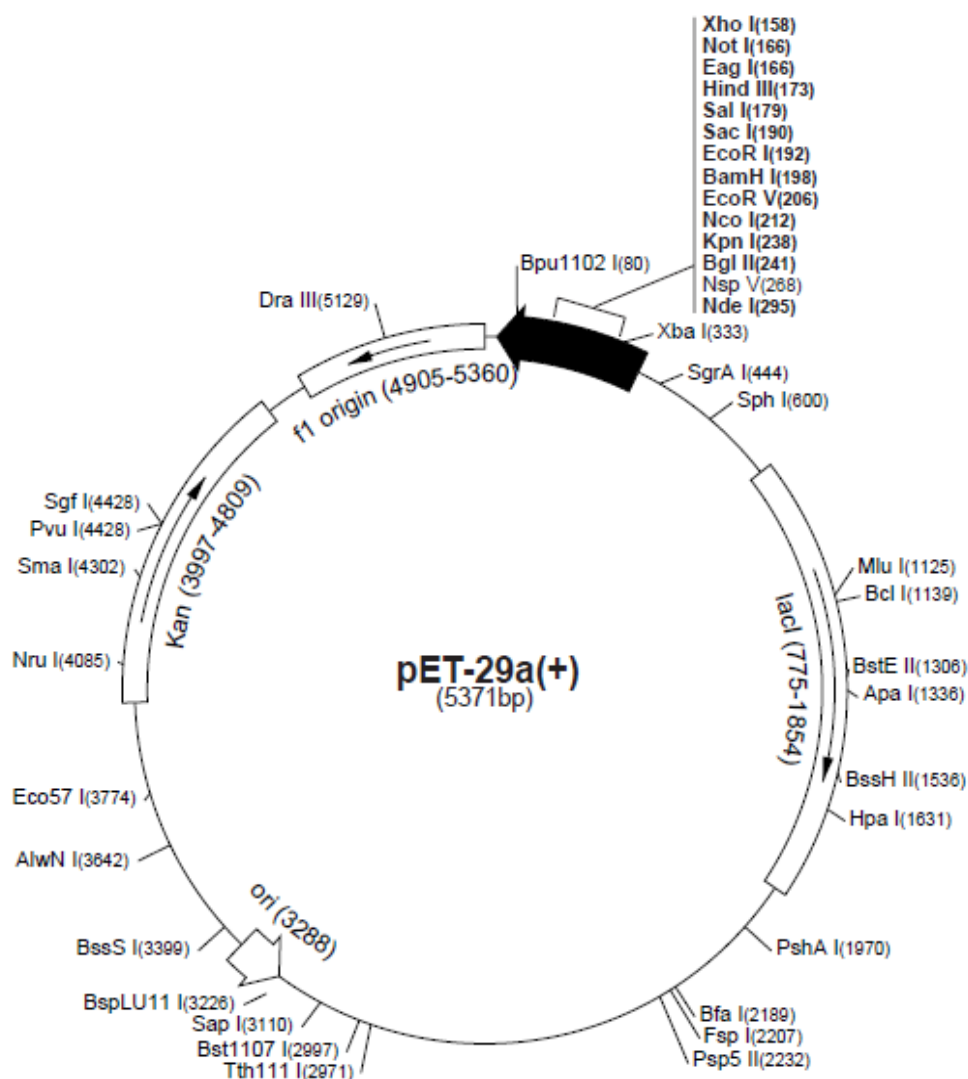
## **4.7 PŘÍPRAVA ANTIGENU, UNIKÁTNÍ ČÁSTI PROTEINU VP2 BK VIRU, NA PŘÍPRAVU PROTILÁTKY**

Naše laboratoř se dlouhodobě zabývá studiem čeledi Polyomaviridae, mezi něž patří mimo jiné lidský virus BK, který způsobuje komplikace především při transplantaci ledvin. Ačkoli je tento virus znám již dlouhou dobu, byl dosud zejména předmětem klinického, nikoli základního výzkumu. Naším prvním cílem je proto popsat základní interakce BK viru s buňkou v průběhu životního cyklu viru. Pro tento výzkum je ovšem nutné disponovat sadou specifických protilátek namířených proti virovým proteinům a jejich částem. V rámci diplomové práce Alexandry Kozmanové (Kozmanová, nepublikovaná data) byla v naší laboratoři vytvořena protilátka proti hlavnímu strukturnímu proteinu VP1 BK viru. Mimo majoritní kapsidový protein obsahuje BK virová kapsida také minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3, přičemž proteiny VP2 a VP3 jsou na svém C konci totožné – VP2 protein obsahuje oproti VP3 navíc na N konci unikátní sekvenci 119 aminokyselin. Jedním z cílů této práce byla příprava antigenu - unikátní části VP2 BKV na přípravu protilátky. Příslušná kódující DNA sekvence antigenu byla nasyntetizována pomocí metody PCR, následně byla vložena do expresního bakteriálního vektoru pET29b. Takto vytvořený konstrukt byl transformován do bakteriálního kmene BL21 a pomocí těchto bakterií byl kýžený antigen vyprodukován a následně vyizolován afinitní chromatografií.

### **4.7.1 Konstrukce expresního vektoru s unikátní částí VP2 BKV**

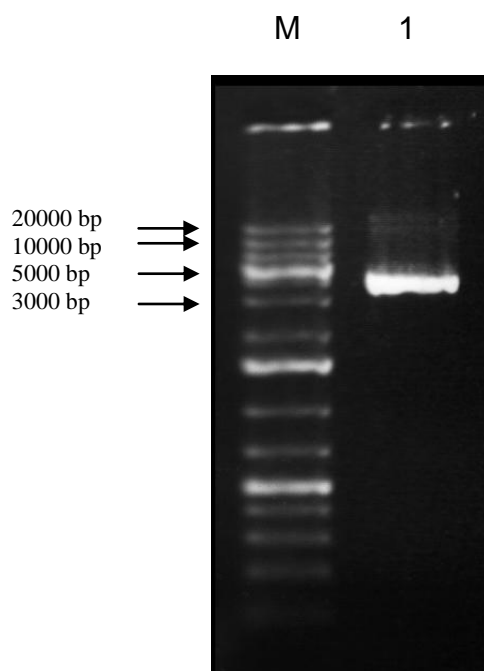
Pro konstrukci byl použit expresní vektor pET29b obsahující kanamycinovou rezistenci (Novagen) (Obr. 4.24). Tento vektor byl vybrán, protože obsahoval kotvu HisTag, která je malá a je vhodná pro izolaci proteinů s cílem následné imunizace zvířete, kanamycinová rezistence nám také vyhovovala a v neposlední řadě se předchozí práce s tímto vektorem dobře osvědčila v naší laboratoři. Unikátní část proteinu VP2 BKV byla připravena pomocí metody PCR tak, aby na jednom konci bylo restrikční místo pro enzym BamH I a na druhém konci štěpící místo pro enzym Xho I. Těmito enzymy byl také naštěpen vektor pET29b. Dvě různé restriktazy byly zvoleny proto, aby nemohlo dojít k zařazení PCR produktu do vektoru v opačné orientaci. Tyto restrikční enzymy byly zvoleny z důvodu jejich dobrých štěpících vlastností. Plazmid pET29b byl pomnožen v bakteriální kultuře a následně byl z této kultury vyizolován pomocí kitu QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) (Obr. 4.25).

Následně byla změřena koncentrace takto vyizolovaného plazmidu pomocí přístroje nanodrop. Naměřená koncentrace plazmidu pET29b byla 61,6 ng/μl. Plazmid (3 μg) byl posléze štěpen pomocí restrikčních enzymů BamH I a Xho I, každým enzymem zvlášť (Obr. 4.26). Mezi štěpeními byl plazmid přečištěn metodou fenol-chloroform. Po úspěšném naštěpení plazmidu restriktázami došlo k defosforylaci pET29b pomocí FastAP fosfatázy.

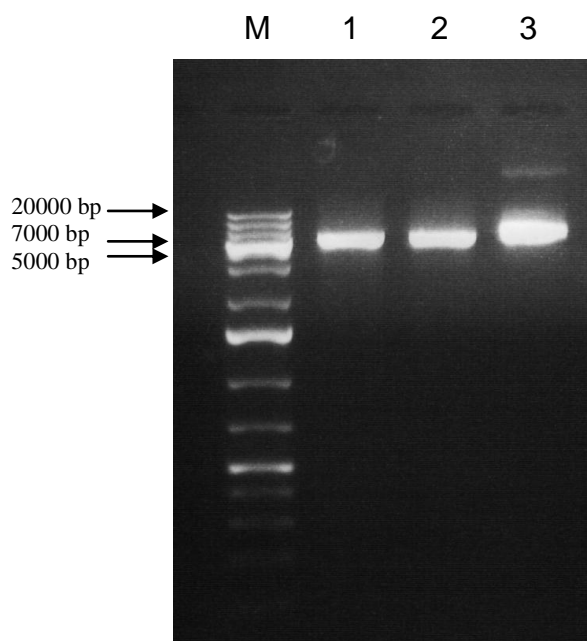




Obr. 4.24: **Mapa vektoru pET29a-c.** Na schématu jsou vyznačeny součásti vektoru pET29a-c včetně jejich umístění. V této práci byl použit vektor pET29b. Použité restrikční enzymy BamH I a Xho I se nacházejí v mnohočetném klonovacím místě. Přes tyto enzymy byla vložena DNA antigenu, za kterou se vyskytuje také DNA kotvy HisTag, která byla použita během afinitní purifikace antigenu. Vektor pET29b obsahuje kazetu zajišťující kanamycinovou rezistenci.

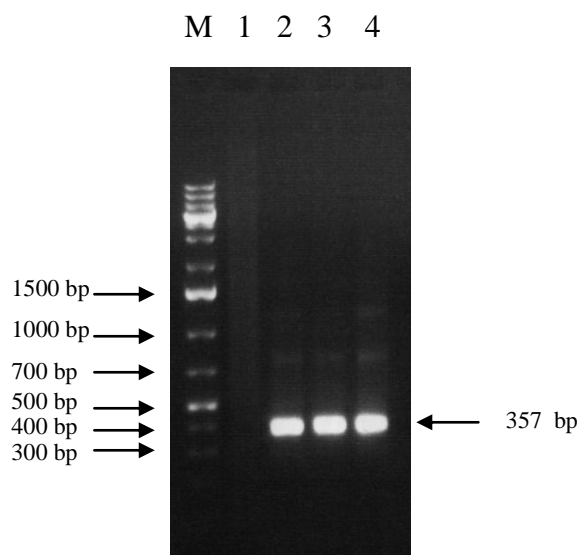


Obr. 4.25: **Agarózová elektroforéza plasmidu pET29b.** M – marker. Dráha č. 1 – plasmidová DNA pET29b vyizolovaná z bakterií pomocí kitu QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen).



Obr. 4.26: Agarózová elektroforéza plazmidu pET29b štěpeného restrikčními enzymy **BamH I** a **Xho I**. M – marker. Dráha č. 1 a 2 – plazmid pET29b štěpený restrikázami BamH I a Xho I. Dráha č. 3 – neštěpený plazmid pET29b.

Dále byla pomocí metody PCR nasyntetizována unikátní část proteinu VP2 BKV o velikosti 357 bp (Obr. 4.27). Byly použity námi navržené primery, z nichž jeden obsahoval restrikční místo rozpoznávané enzymem BamH I a druhý primer zahrnoval sekvenci štěpenou restrikázou Xho I (kapitola 3.1.8). Jako templát byl použit plazmid c734A, který obsahuje celý genom BK viru. K vytvoření unikátní části VP2 BKV byly udělány tři totožné PCR reakce. Vzniklý materiál byl sražen a naštěpen najednou restrikčními enzymy BamH I a Xho I. Během PCR došlo mimo vytvoření unikátní části VP2 BKV také ke vzniku nespecifických úseků DNA, proto bylo přistoupeno po PCR a štěpení PCR produktu k izolaci unikátní části VP2 BKV z agarózového gelu pomocí kitu NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) (Obr. 4.28). DNA byla před nanesením do agarózového gelu za účelem její izolace a před štěpením restrikázami sražena, abychom minimalizovali množství agarózového gelu okolo izolované DNA a tím maximalizovali výtěžek izolace. Abychom ověřili, zda je PCR produkt naštěpen, byla následně DNA unikátní části VP2 BKV navzájem ligována. Výsledkem byl vznik konkatemer DNA o velikosti násobku délky PCR produktu, konkrétně lze pozorovat na snímku z agarózové DNA elektroforézy 3 proužky o velikosti přibližně 357bp, 714 bp a 1071bp (Obr. 4.29).



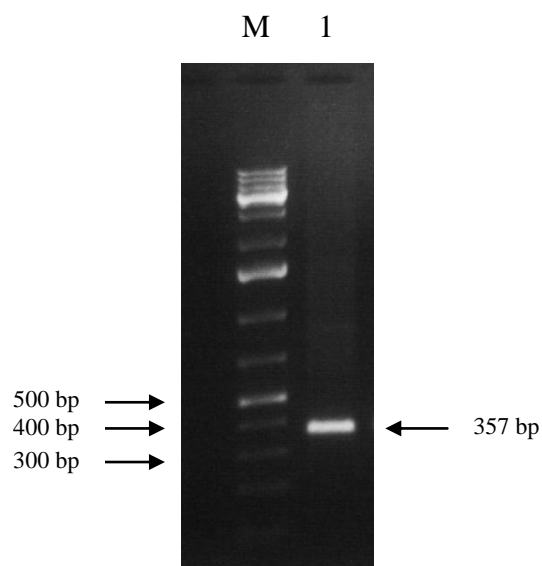
Obr. 4.27: Agarózová elektroforéza DNA pro unikátní část VP2 BKV vzniklé pomocí PCR. M - marker. Dráha č. 1 – Negativní kontrola, PCR reakce bez přítomnosti templátu. Dráha č. 2, 3, 4 – DNA pro unikátní část VP2 BKV, která vznikla metodou PCR z templátu c734A. V PCR reakci byly použity primery z Obr. 4.6. Kromě žádané DNA o velikosti 357bp došlo také ke vzniku nespecifických úseků DNA.

#### Nukleotidová sekvence unikátní části proteinu VP2 BKV:

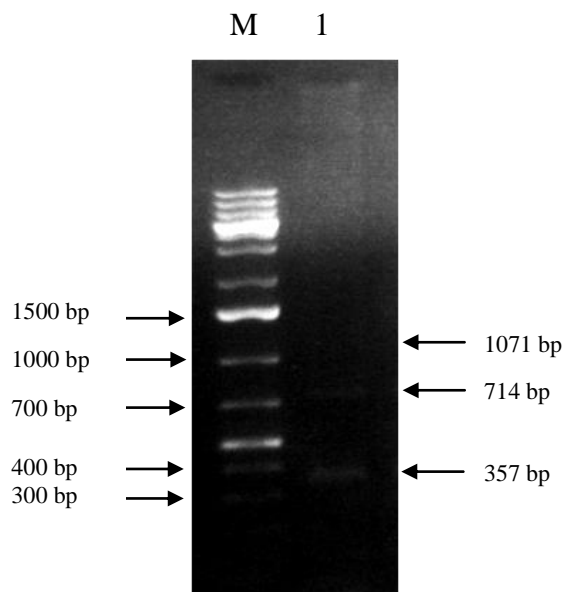
```

          atgggtg  ctgctctagc  acttttgggg  gacctagtgtg
ccagtgtatc  tgaggctgct  gctgccacag  gattttcagt  ggctgaaatt
gctgctgggg  aggctgctgc  tgctatagaa  gttcaaattg  catcccttgc
tactgtagag  ggcataacaa  gtacctcaga  ggctatagct  gctataggcc
taactcctca  aacatatgct  gtaattgctg  gtgctcctgg  ggctattgct
gggtttgctg  ctttaattca  aactgttagt  ggtattagtt  ccttagctca
agtaggggat  aagttctttg  atgattggga  tcacaaagtt  tccactgtag
gcctctatca  gcaatcaggc

```



Obr. 4.28: Agarózová elektroforéza DNA pro unikátní část VP2 BKV po izolaci z agarózového gelu. M – marker. Dráha č. 1 – DNA pro unikátní část VP2 BKV po izolaci z gelu pomocí kitu NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel).



Obr. 4.29: Agarózová elektroforéza po vzájemné ligaci štěpené unikátní části VP2 BKV. M – marker. Dráha č.1 – vzájemně ligované molekuly DNA unikátní části VP2 BKV štěpené enzymy BamH I a Xho I. Došlo ke vzniku konkatemer dvou až tří molekul DNA o celkové velikosti 714 bp a 1071bp.

Dále bylo přistoupeno k ligaci vektoru pET29b, který byl naštěpen enzymy BamH I a Xho I a také defosforylován s DNA unikátní části VP2 BKV, která byla připravena pomocí PCR a také naštěpena enzymy Bam H I a Xho I a přečištěna izolací z agarózového gelu.

Vektor s vkládaným fragmentem byly ligovány. Jako negativní kontrola byl ligován i samotný defosforylovaný vektor pET29b, štěpený enzymy BamH I a Xho I. Poté bylo přistoupeno k transformaci kompetentních bakteriálních buněk XL1blue ligační směsí plazmidu pET29b s unikátní částí VP2 BKV (20 ng DNA) metodou elektroporace. Jako negativní kontrola byla elektroporována také ligační směs obsahující pouze defosforylovaný a štěpený plazmid pET29b (20 ng DNA). Jako pozitivní kontrola byl vpraven do kompetentních bakterií neštěpený prázdný plazmid pET29b (24 ng DNA). Po elektroporaci byly bakterie vysety na misky s agarem ve třech různých ředěních: 10x ředěné – v tomto případě vyrostly jednotky bakteriálních monoklonií, neředěné – zde vyrostly desítky monoklonií bakterií a jako poslední byl vyset veškerý zbytek transformovaných bakterií – v tomto případě vyrostly stovky kolonií bakterií. Bakterie, do nichž byl elektroporován samotný štěpený a defosforylovaný plazmid pET29b byly vysety všechny na jednu misku s agarem a zde další den ráno bylo 20 monoklonií bakterií. Dále byly vysety samotné netransformované kompetentní buňky XL1blue 2x ředěné a zde nevyrostla ani jedna bakteriální kolonie. Jako pozitivní kontrola byly vysety také neředěné bakterie transformované neštěpeným prázdným plazmidem pET29b – v tomto případě byla další den ráno miska s agarem celá poseta hustou sítí bakterií (shrnuje v Tab. 4.14).

<b>Jaké bakterie a v jakém ředění byly vysévány na misku s agarem obsahujícím kanamycin</b>	<b>Počet vyrostlých monoklonií</b>
bakterie transformované vektorem s unikátní částí VP2 BKV (10x ředěné)	jednotky
bakterie transformované vektorem s unikátní částí VP2 BKV (neředěné)	desítky
bakterie transformované vektorem s unikátní částí VP2 BKV (zbytek)	stovky
bakterie transformované samotným štěpeným a defosforylovaným plazmidem pET29b (vše) - NK	20
samotné netransformované kompetentní buňky XL1blue (2x ředěné) - NK	0
bakterie transformované neštěpeným prázdným plazmidem pET29b (neředěné) - PK	hustá síť bakterií (nelze rozlišit monokolonie)

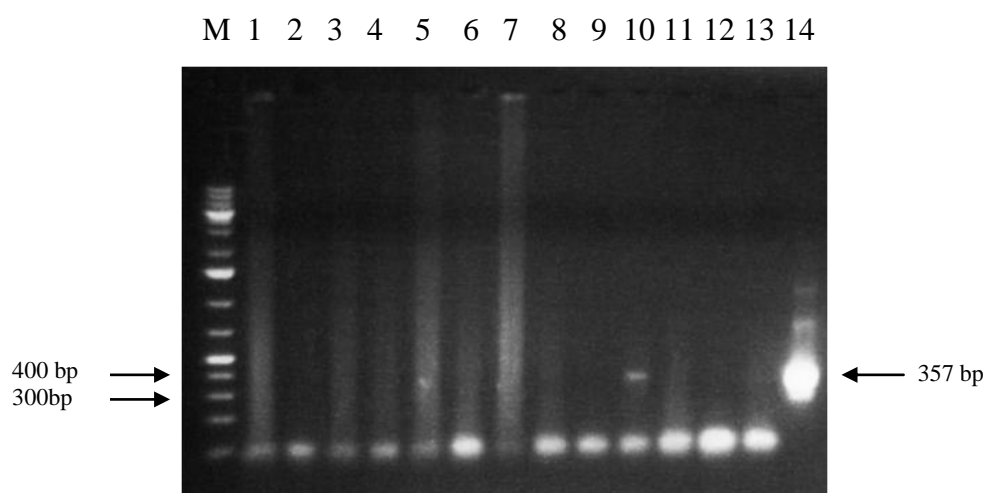
Tab. 4.14: **Výsledek transformace bakteriálních kompetentních buněk XL1blue vektorem s unikátní částí VP2 BKV a příslušnými kontrolami.** Transformované bakterie byly vysety na agarové misky s kanamycinem a následný den byl sledován počet vyrostlých bakterií. NK – negativní kontrola, PK – pozitivní kontrola.

Následně bylo přistoupeno k testování monoklonií bakterií vyrostlých na agarových plotnách, zda obsahují námi požadovaný plazmid pET29b s vloženou DNA unikátní částí VP2 BKV. Do 12 zkumavek s živným bujónem s kanamycinem bylo zaočkováno 12 náhodně vybraných monoklonií bakterií z agarové misky, kde vyrostly bakterie transformované DNA konstruktem pET29b s unikátní částí VP2 BKV. Metodou popsanou v kapitole 3.2.8.2 byla ze zaočkovaných bakterií izolována plazmidová DNA. Přítomnost DNA unikátní části VP2 BKV v těchto izolátech byla ověřena metodou PCR. K PCR reakci byly použity primery MV\_počátek a MV\_konec, které ohraničují unikátní část VP2 BKV (kapitola 3.1.8). Plazmidová DNA z bakteriálních monoklonií 1 – 9 a 11 – 12 neobsahovala DNA unikátní části VP2 BKV, avšak bakteriální monokolonie číslo 10 tento fragment obsahovala (Obr. 4.30).

Poté byla znovu izolována plazmidová DNA z pozitivní bakteriální monokolonie číslo 10 a poslána na sekvenaci za účelem zjištění zda je vložený fragment v pořádku. Také byla vytvořena bakteriální konzerva z této pozitivní monokolonie číslo 10.



Výsledek sekvenace ukázal, že v DNA unikátní části VP2 BKV, která je přítomna v bakteriích monokolonie číslo 10, se oproti originální sekvenci vytvořily tři mutace (Obr. 4.31). Nejedná se o mutace, které by způsobily posun čtecího rámce. Všechny mutace se vyskytují u N konce unikátní části VP2 BKV. První mutace se vyskytovala na třetím místě 94. kodonu, místo tripletu TTA se objevil triplet TTG. Druhá mutace se objevila v kodonu AAG na pozici 100, místo tohoto tripletu vznikl mutovaný triplet AGG. Třetí mutace vznikla v kodonu GAT na pozici 103, kde se vyskytl mutovaný triplet AGT. Dále jsme pracovali s tímto konstruktem (viz kapitola 5.7).



Obr. 4.30: **Agarózová elektroforéza po PCR reakci, kde byla templátem plazmidová DNA z bakterií transformovaných vektorem pET29b s unikátní částí VP2 BKV.** M – marker. Dráha č. 1 – 12 – výsledek PCR reakce, kde jako templát sloužila plazmidová DNA z bakterií transformovaných vektorem pET29b s unikátní částí VP2 BKV. Dráha č. 13 – negativní kontrola PCR reakce, ve směsi nebyl přítomen templát. Dráha č. 14 – pozitivní kontrola PCR reakce, ve směsi byl použit templát c734A. Ve všech PCR reakcích byly použity primery ohraničující unikátní část VP2 BKV (kapitola 3.1.8).

A)

Délka=357

Identita = 354/358 (99%), Mezery = 2/358 (0%)

```

Query 1 ATGGGTGCTGCTCTAGCACTTTTGGGGGACCTAGTTGCCAGTGTATctgaggctgctgct 60
      |||||||
Sbjct 1 ATGGGTGCTGCTCTAGCACTTTTGGGGGACCTAGTTGCCAGTGTATCTGAGGCTGCTGCT 60

Query 61 gccacaggatttttcagtggctgaaattgctgctggggaggctgctgctgctATAGAAGTT 120
      |||||||
Sbjct 61 GCCACAGGATTTTCAGTGGCTGAAATTGCTGCTGGGGAGGCTGCTGCTGCTATAGAAGTT 120

Query 121 CAAATTGCATCCCTTGCTACTGTAGAGGGCATAACAAGTACCTCAGAGGCTATAGCTGCT 180
      |||||||
Sbjct 121 CAAATTGCATCCCTTGCTACTGTAGAGGGCATAACAAGTACCTCAGAGGCTATAGCTGCT 180

Query 181 ATAGGCCTAACTCCTCAAACATATGCTGTAATTGCTGGTGCTCCTGGGGCTATTGCTGGG 240
      |||||||
Sbjct 181 ATAGGCCTAACTCCTCAAACATATGCTGTAATTGCTGGTGCTCCTGGGGCTATTGCTGGG 240

Query 241 TTTGCTGCTTTAATTCAAACCTGTTAGTGGTATTAGTTCCTTAGCTCAAGTAGGGTATAAG 300
      |||||||
Sbjct 241 TTTGCTGCTTTAATTCAAACCTGTTAGTGGTATTAGTTCCTTAGCTCAAGTAGGGTATAAG 300

Query 301 TTCTTT-GATGATTGGGATCACAAAGTTTCCACTGTAGGCCTCTATCAGCAATCAGGC 357
      |||||||
Sbjct 301 TTCTTTAG-TGATTGGGATCACAAAGTTTCCACTGTAGGCCTCTATCAGCAATCAGGC 357

```

B)

ATG GGT GCT GCT CTA GCA CTT TTG GGG GAC CTA GTT GCC AGT GTA TCT  
GAG GCT GCT GCT GCC ACA GGA TTT TCA GTG GCT GAA ATT GCT GCT GGG  
GAG GCT GCT GCT GCT ATA GAA GTT CAA ATT GCA TCC CTT GCT ACT GTA  
GAG GGC ATA ACA AGT ACC TCA GAG GCT ATA GCT GCT ATA GGC CTA  
ACT CCT CAA ACA TAT GCT GTA ATT GCT GGT GCT CCT GGG GCT ATT GCT  
GGG TTT GCT GCT TTA ATT CAA ACT GTT AGT GGT ATT AGT TCC TTG GCT  
CAA GTA GGG TAT AGG TTC TTT AGT GAT TGG GAT CAC AAA GTT TCC ACT  
GTA GGC CTC TAT CAG CAA TCA GGC

Obr. 4.31: Výsledek sekvenace konstruktů pET29b s unikátní částí VP2 BKV. A)

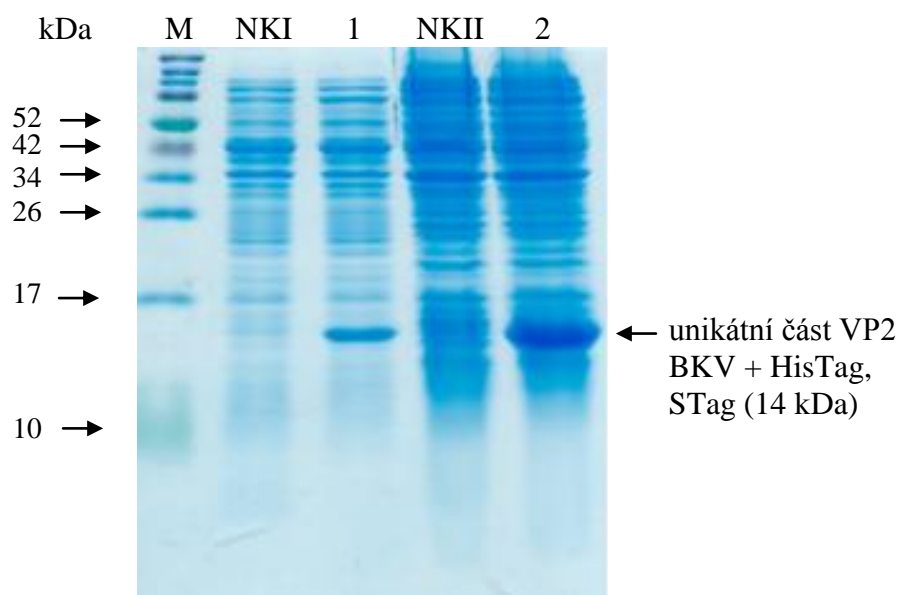
Query = analyzovaná sekvence, Sbjct = vzorová sekvence. Námi připravený konstrukt pET29b s unikátní částí VP2 BKV byl srovnán se vzorovou sekvencí unikátní části VP2 BKV. V námi připraveném konstrukt došlo ke dvěma substitučním mutacím a dále k posunu jednoho nukleotidu o dvě pozice vpřed. Žádná z těchto mutací neznamenal posun čtecího rámce. Mutace jsou vyznačeny červeně. Analýza sekvence byla provedena v programu Blast. B) Sekvence unikátní části VP2 BKV z konstruktů pET29b s unikátní částí VP2 BKV rozdělená podle tripletů. Mutace jsou označeny červeně. Všechny mutace se vyskytují na konci sekvence.

#### 4.7.2 Produkce unikátní části VP2 BKV

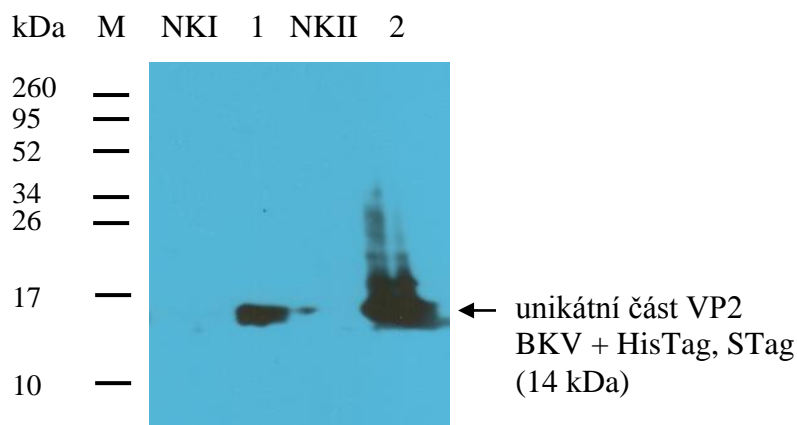
Po úspěšné konstrukci plazmidu pET29b s vloženou unikátní částí VP2 BKV bylo možné přistoupit k produkci proteinu - unikátní části VP2 BKV. Za tímto účelem bylo nutné vpravit připravený konstrukt do jiného bakteriálního kmene *E.Coli*, který by byl schopen vysoké produkce požadovaného proteinu. My jsme zvolili bakteriální kmen BL21, jehož genomová DNA kóduje v araB lokusu bakteriofágovou T7 RNA polymerázu. Inducibilní exprese T7 RNA polymerázy zajistí vysokou úroveň transkripce z vektoru obsahující T7 promotor, jímž je také námi použitý vektor pET29b.

Z monokolonie číslo 10 byla izolována plazmidová DNA, která byla následně elektroporována do kompetentních buněk *E.coli* kmene BL21. Jako negativní kontrola byly buňky BL21 transformovány také prázdným plazmidem pET29b. Po elektroporaci plazmidů byly bakteriální buňky vysety v různém ředění na agarové plotny s kanamycinem. Následně byla vybrána jedna monokolonie bakterií obsahující námi připravený konstrukt a také jedna monokolonie obsahující prázdný plazmid pET29b jako negativní kontrola. V obou případech byly vytvořeny bakteriální konzervy. Obě vybrané monokolonie byly zaočkovány do živného bujónu s kanamycinem a inkubovány přes noc při 37°C. Další den byla přes noc narostlá kultura naředěna 100x a dále kultivována při průběžném měření optické denzity, dokud její hodnota nedosáhla 0,6 – 0,8 při 600 nm. Bakterie zpočátku rostly hodně pomalu a požadované OD dosáhly po 6 hodinách růstu od naředění. Poté bylo k bakteriálním kulturám přidáno IPTG (konečná koncentrace 1mM) a kultura byla třepána 2h při 28°C. Následně byla bakteriální kultura stočena a rozdělena na dvě části. Dále jsme volili takové postupy, abychom zjistili, zda se unikátní část VP2 BKV produkuje ve formě rozpustného proteinu či zda se bude nalézat pouze ve frakci nerozpustných proteinů (kapitola 3.2.9.1). S výslednými produkty byla provedena SDS-PAGE (kapitola 3.2.9.2). Spodní akrylamidový gel byl volen 15%, protože unikátní část VP2 BKV má pouze 12 kDa a spolu s kotvami STag a HisTag a okolními sekvencemi cca 14 kDa. Jeden gel byl obarven Coomassie Brilliant Blue G 250 (Obr. 4.32 A) a druhý gel byl přebílen na nitrocelulózovou membránu a následně byla provedena imunodetekce unikátní části VP2 BKV použitím protilátky proti HisTagové kotvě (Obr. 4.32 B). Výsledkem bylo zjištění, že bakterie skutečně vyprodukovaly unikátní část VP2 BKV. Tento protein se vyskytoval ve frakci obsahující všechny produkované proteiny a také ve frakci obsahující pouze rozpustné proteiny. Proužek žádané velikosti se neobjevil u vzorků s prázdným plazmidem pET29b.

A)



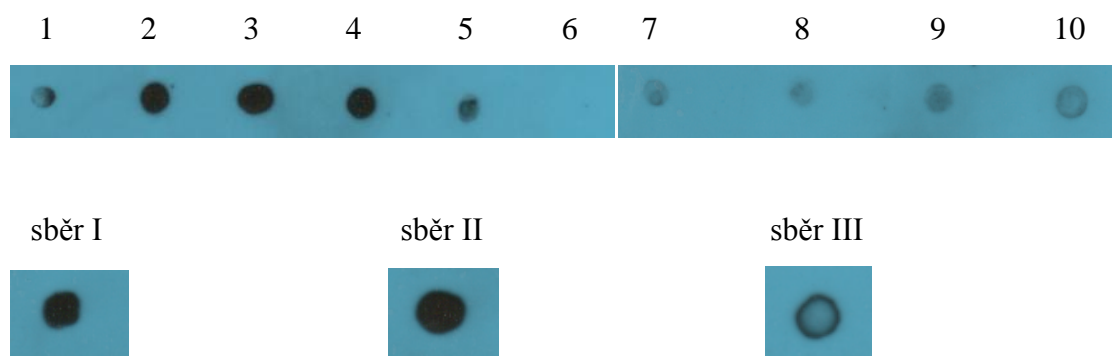
B)



Obr. 4.32: Elektroforetická separace SDS-PAGE lyzátu bakterií indukovaných k produkci proteinu z DNA konstruktu pET29b s unikátní částí VP2 BKV (A) a následný western blot (B). M – marker. NKI – frakce rozpustných proteinů z lyzátu bakterií obsahujících prázdný pET29b. Vzorek č. 1 - frakce rozpustných proteinů z lyzátu bakterií obsahujících DNA konstrukt pET29b s unikátní částí VP2 BKV. NKII – celobuněčný lyzát z bakterií obsahujících prázdný pET29b. Vzorek č. 2 - celobuněčný lyzát z bakterií obsahujících DNA konstrukt pET29b s unikátní částí VP2 BKV. A) SDS-PAGE, 15% gel obarven CBB G 250. B) Western blot následován imunodetekcí histidinové kotvy. Byla použita primární myší protilátka Penta-His detekující HisTag a sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

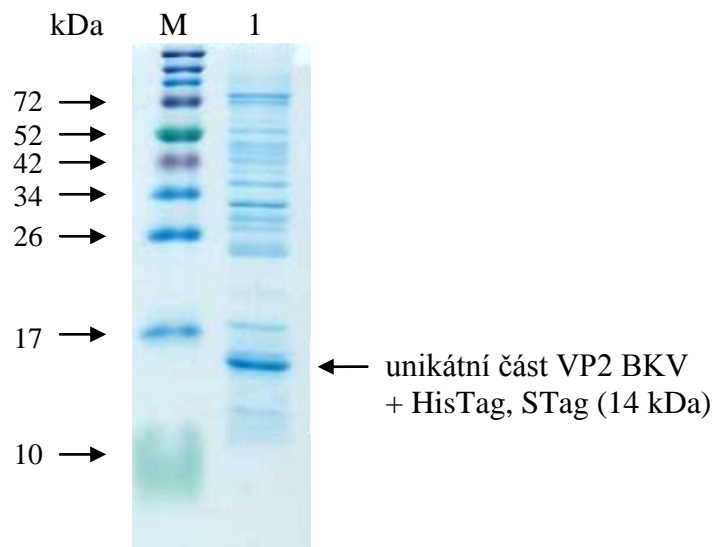
#### 4.7.3 Izolace unikátní části VP2 BKV

Po otestování úspěšné produkce unikátní části VP2 BKV bylo možno přistoupit k produkci proteinu ve větším množství a následné izolaci proteinu založené na principu afinitní chromatografie. Bylo využito kotvy HisTag umístěné za unikátní částí VP2 BKV. Těchto šest histidinů tvořících HisTag má afinitu k nikelnatým iontům. K izolaci proteinu byly použity kolony od GE Healthcare s názvem HisTrap FF crude 1 ml. Nejprve jsme vyprodukovali protein - unikátní část VP2 BKV postupem popsáním v kapitole 3.2.7.5. V tomto případě byla indukována produkce proteinu ve 100 ml bakteriální kultury. Následně byl připraven vzorek a protein purifikován dle manuálu od výrobce (kapitola 3.2.9.8). V průběhu purifikace došlo ke sběru kontrolních vzorků v klíčových krocích izolace proteinu. Byla odebrána část vstupního materiálu, který byl nanášen na kolonu – sběr I. Dále byl jímán vzorek po protečení kolonou – sběr II. Také byl uschován vzorek po promytí kolony vazebným pufrem za účelem odmytí nespecificky navázaných proteinů – sběr III. Eluce navázaného proteinu, unikátní části VP2 BKV navázané přes HisTag k  $\text{Ni}^{2+}$  iontům, byla provedena pomocí elučního pufru, který obsahoval 500mM imidazol. Celkový objem eluátu byl 10 ml, eluát byl jímán po 1ml do deseti frakcí. Poté byl proveden dotblot (kapitola 3.2.9.5) s jednotlivými vylučovanými frakcemi a sběry v průběhu purifikace za účelem zjištění, ve kterých frakcích se požadovaný protein nachází (Obr. 4.33). Membrána s jednotlivými kapkami vzorků byla detekována protilátkou proti histidinové kotvě. Nejvíce požadovaného proteinu se nacházelo ve frakcích 1-4. Izolovaný protein byl dle očekávání detekován také ve vstupním materiálu a bohužel i ve sběru II, což mohlo mít za následek menší výtěžek purifikace. Ve sběru III se proteinu již mnoho nenacházelo. Dále byly frakce eluátu 1-4 spojeny a pomocí dialýzy proti PBS byl ze vzorku odstraněn imidazol. V průběhu dialýzy došlo k mírnému sražení proteinu. Po dialýze byl protein rozplněn do aliquotů a zamražen při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Poté byla provedena ještě analýza získaného proteinu pomocí SDS-PAGE (Obr. 4.34 A) a následného western blotu s imunodetekcí proteinu za použití protilátky proti histidinové kotvě (Obr. 4.34 B). Podle obarveného gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue G 250 se po purifikaci unikátní části VP2 BKV vyskytují ve vzorku i jiné proteiny, ale námi požadovaný protein je zastoupen v největší míře. Na závěr došlo ke změření koncentrace získané unikátní části VP2 BKV pomocí metody Bradfordové (kapitola 3.2.9.7). Výsledná koncentrace získaného roztoku obsahující námi požadovaný protein, unikátní část VP2 BKV, byla 0,23 mg/ml. Celkový objem tohoto roztoku byl 4 ml. Takto připravená unikátní část proteinu VP2 BKV může být použita na imunizaci zvířete za účelem získání protilátky.

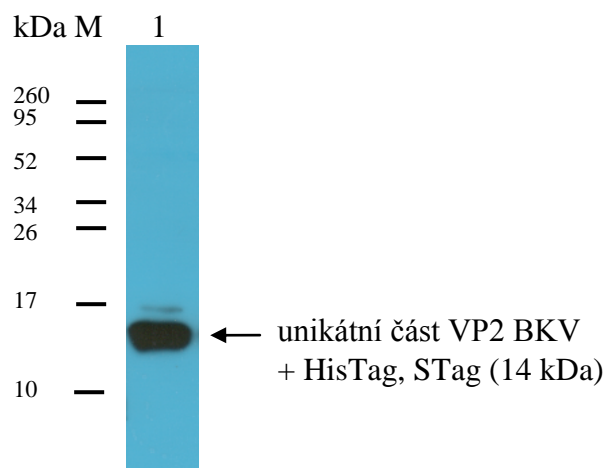


Obr. 4.33: **Dotblot s elučními frakcemi a kontrolními sběry vzorků během afinitní purifikace unikátní části VP2 BKV.** Nejvíce žádaného proteinu se nachází po eluci ve frakcích 1-4. Sběr I je vstupní materiál, kde se výskyt izolovaného proteinu předpokládá. Sběr II je vzorek jímáný po protečení kolonou, zde je vidět, že všechen vzorek nebyl zachycen nikelnatými ionty v koloně. Sběr III reprezentuje vzorek po promytí kolony vazebným puforem pro odmytí nespecificky navázaných proteinů. V tomto sběru se nenachází mnoho unikátní části VP2 BKV. Byla použita primární myší protilátka Penta-His detekující HisTag a sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

A)



B)



Obr. 4. 34: **Elektroforetická separace SDS-PAGE s purifikovaným proteinem unikátní části VP2 BKV(A) a následný western blot (B).** M – marker. Vzorek č. 1 – unikátní část VP2 BKV spolu s kotvami HisTag a STag. Vyprodukovaný protein prodělal proces purifikace pomocí histidinové kotvy a její afinity k  $\text{Ni}^{2+}$  iontům. K purifikaci požadovaného proteinu nedošlo na sto procent, ve vzorku se stále vyskytují i jiné proteiny, ale v menší míře a většina materiálu ve vzorku je námi požadovaná unikátní část VP2 BKV. A) SDS-PAGE, 15% gel obarven CBB G 250. B) Western blot následován imunodetekcí histidinové kotvy. Byla použita primární myší protilátka Penta-His detekující HisTag a sekundární protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou.

## **5. Diskuze**



## **5.1 Izolace polyomavirů – měření infekčního titru viru**

Jedním z cílů této diplomové práce bylo optimalizovat určení infekčního titru viru pomocí průtokové cytometrie. Tato metoda byla již dříve použita pro určení titru viru SV40 (Drayman *et al.* 2010). My jsme pokusy prováděli na MPyV, který je v naší laboratoři zkoumán nejvíce. Výsledky jsme srovnali s určením infekčního titru viru pomocí imunofluorescence a plakové zkoušky. Určení virového titru pomocí imunofluorescence je časově náročnější a subjektivnější než jeho určení pomocí průtokového cytometru, protože je zapotřebí jednotlivě spočítat stovky buněk, přičemž intenzita fluorescence se (není-li k dispozici speciální přístroj) hodnotí pouhým okem. Průtokový cytometr spočítá infikované buňky za nás, dokáže spočítat desítky tisíc buněk v řádu minut a hodnocení intenzity fluorescence je přesnější. Obě zmíněné metody jsou založeny na detekci exprese LT antigenu polyomaviru. Většinou obě tyto metody dávají stejný výsledek, výjimku tvoří MEF buňky, kde je rozdíl získaných titrů jeden řád. Výsledek plakové zkoušky je řádově nižší, což může být způsobeno jinak konstruovaným vzorcem pro výpočet virového titru a obecně jiným principem metody určení titru viru a v neposlední řadě rozdílnou citlivostí MEF buněk na zkoumaný virus. Pro určení virového titru lze tedy použít vyhodnocování fluorescence jak na průtokovém cytometru, tak na fluorescenčním mikroskopu, případně kombinaci obou metod.

## **5.2 Vyloučení proteolytické aktivity přítomné v používaném virovém inokulu**

Virová inokula byla otestována na přítomnost proteáz chymotrypsinové a trypsinové aktivity. V inokulu se žádné tyto proteázy nevyskytovaly. Ukázalo se, že inhibitor proteazómů MG-132 dobře inhibuje chymotrypsinovou aktivitu proteazómů, ale trypsinovou už ne tak dobře. Tyto výsledky korespondují s literaturou a navíc bylo popsáno, že pro inhibici degradace proteinů je nejdůležitější inhibice chymotrypsinové aktivity (Kisselev a Goldberg 2001).

### 5.3 Vliv proteazomální inhibice na produkci proteinu LT v různých fázích infekce MPyV

Naším cílem bylo sledovat interakce hostitelského proteazomálního systému s časnými fázemi infekce myším polyomavirem. Nejvíce nás zajímala fáze dopravy virionu do buněčného jádra, ke které musí dojít během časně fáze infekčního cyklu MPyV. Krátce po dopravení virové DNA do jádra dochází k expresi virového časného proteinu LT, který jsme si zvolili jako marker dosažení virové DNA jádra. Nejprve byly myší fibroblasty infikované MPyV vystaveny účinku reverzibilního proteazomálního inhibitoru MG-132 o konečné koncentraci 20 $\mu$ M. Tato koncentrace je vhodná pro krátkodobé působení do 5 hod. (DP, Schenková, 2006; DP, Čáslavský, 2009), ale dlouhodobější kultivace buněk s 20 $\mu$ M MG-132 má značné cytotoxické účinky (kapitola 4.5). Z tohoto důvodu jsme dále používali MG-132 o finální koncentraci 2 $\mu$ M (Johnson a Samulski 2009, Tran *et al.* 2010). Výsledky získané při pokusech s oběma výše uvedenými koncentracemi MG-132 vykazovaly tutéž tendenci. Ze série pokusů bylo zjištěno, že pokud je MG-132 přítomen na buňkách 4 hodiny v různých časech MPyV infekce, avšak vždy v časných fázích infekce (minus 3,5 hod až plus 8 hodin, 0 je čas infekce), procento LT pozitivních buněk mírně stoupá (okolo 18% oproti kontrole, infikovaným buňkám bez inhibitoru). Největší nárůst procenta LT pozitivních buněk (o 32%) nastal v případě přidání MG-132 3,5 hod před infekcí a jeho odmytí 0,5 hod po infekci. Z těchto výsledků vyplývá, že pravděpodobně proteazómy v časně fázi infekce MPyV nepomáhají dosažení jádra a expresi LT antigenu. Naopak pokud jsou proteazómy zainhibovány, procento LT pozitivních buněk se mírně zvýší, což může být zapříčiněno poklesem degradace virových částic pomocí proteazómů. Také musíme brát v potaz, že inhibitor proteazómů MG-132 není specifický pouze vůči proteazómům, ale inhibuje i některé lyzozomální cysteinové proteázy a kalpainy (Lee a Goldberg 1998).

V naší laboratoři byly dříve provedeny velmi podobné experimenty sledující vliv proteazomálního inhibitoru MG-132 na infekci viru SV40 pomocí detekce proteinu LT. Výsledky vykazovaly tutéž tendenci jako výsledky popsané v této diplomové práci, provedené na MPyV (kapitola 4.3). Krátkodobá přítomnost MG-132 během prvních 8 hodin infekce měla také za následek zvýšení procenta LT pozitivních buněk. Rozdíl byl v tom, že ve většině případů byl nárůst procenta LT pozitivních buněk daleko větší než v případě pokusů s MPyV. K největšímu nárůstu došlo během prvních dvou hodin infekce a to na 280% LT pozitivních buněk.

V tomto čase dochází k dopravě virionů od plazmatické membrány k endoplazmatickému retikulu a během této fáze mohou být viriony degradovány v endolyzozómech, ve kterých se vyskytují proteázy inhibovatelné MG-132. Inhibice těchto endolyzozomálních proteáz by mohla vysvětlit výše zmiňované zvýšení procenta LT pozitivních buněk. Druhé výrazné zvýšení procenta LT pozitivních buněk bylo pozorováno během inhibice pomocí MG-132 v intervalu 4 - 8 hpi (216%). Toto zvýšení může být zapříčiněno zabráněním proteazomální degradace virionů (shrnutí v DP, Čáslavský, 2009). MPyV a virus SV40 jsou si tedy podobné v tendenci nárůstu LT pozitivních buněk v přítomnosti MG-132. V obou případech má proteazomální inhibice během časně fáze infekce pozitivní vliv na množství virového proteinu LT. Můžeme tedy shrnout, že proteazómy či jiné proteázy inhibovatelné MG-132 spíše zabraňují virionům dosáhnout jádra hostitelské buňky, než že by byly potřebné během dopravy virového genomu do jádra, jak to bylo popsáno u jiných virů (Ros *et al.* 2002, Ros a Kempf 2004). Konkrétní mechanismus těchto dějů ale není znám a pro jeho objasnění by byly potřeba další experimenty.

Ve chvíli, kdy proteazomální inhibitor MG-132 byl přítomen na infikovaných buňkách po celou dobu infekce, procento LT pozitivních buněk velmi výrazně kleslo až na 1% kontroly. Snižování počtu LT pozitivních buněk bylo pozorováno již i v případě přítomnosti MG-132 v prvních 12 hodinách infekce. Podobných výsledků bylo dosaženo také u viru SV40 (Schelhaas *et al.* 2007). Tento efekt je pravděpodobně zapříčiněn negativním vlivem proteazomální inhibice na replikaci DNA, eventuálně expresi proteinů, jak bude diskutováno dále (kapitola 4.6, Luo *et al.* 2003, Satheshkumar *et al.* 2009). Stejných výsledků bylo dosaženo při použití ireverzibilního proteazomálního inhibitoru epoxomicinu. Procento LT pozitivních buněk při použití epoxomicinu kleslo na 2,7% kontroly. Tento inhibitor nelze odmyt a jeho použití je tudíž velmi podobné situaci, kdy je reverzibilní inhibitor proteazómů MG-132 ponechán na infikovaných buňkách celou dobu infekce. Rozdíl je v tom, že epoxomicin je více specifický vůči proteazómům a neinhibuje jiné proteázy, jako jsou katepsiny, kalpain, papain, trypsin nebo chymotrypsin (Meng *et al.* 1999, Groll a Huber 2004). Podobné výsledky byly publikovány pro BK virus, přičemž místo epoxomicinu byl použit ireverzibilní proteazomální inhibitor lactacystin (Jiang *et al.* 2009).

## **5.4 Sledování vzájemné lokalizace proteazómů a proteinu VP1 MPyV a viru SV40**

Jako další metodu pro zjištění, zda dochází k interakci polyomavirů s proteazomálním systémem hostitelských buněk, jsme zvolili fluorescenční značení obalového proteinu VP1 myšího polyomaviru nebo viru SV40 a proteazómů a následné sledování obou struktur konfokálním mikroskopem. Sledování vzájemné lokalizace zmíněných struktur byla provedena 4 hpi. Snímky z konfokálního mikroskopu byly pořízeny Mgr. Ondřejem Šebestou stejně jako následná analýza snímků. Na řezech infikovaných buněk nelze pouhým okem pozorovat mnoho vzájemně se překrývajících signálů pro proteazómy a virový protein VP1. Následná analýza snímků ukázala okolo 10% kolokalizujících signálů proteinu VP1 s proteazómy a to jak v případě MPyV, tak v případě viru SV40. Pokud byla infikovaná buněčná kultura ošetřena proteazomálním inhibitorem MG-132 po celou dobu infekce, procento nalezených kolokalizací se velmi mírně zvýšilo: v případě MPyV na 12,6% a v případě viru SV40 na 13,9% nalezených kolokalizací mezi virovým proteinem VP1 a 20S proteazómy. Tento mírný nárůst může být způsoben tím, že v případě inhibice proteazómů nedochází k degradaci ubiquitinylovaných proteinů a tím pádem se tyto nedegradované proteiny hromadí a hypoteticky může tedy docházet ke kumulaci ubiquitinylovaného proteinu VP1 v okolí proteazómů. Avšak i v tenkém řezu je proteazómů mnoho a překryvy se špatně pozorují i při použití dekonvolučního programu a z těchto důvodů lze spíše konstatovat, že mezi vzorky ošetřenými inhibitorem proteazómů a vzorky neošetřenými MG-132 signifikantní rozdíly nejsou. Vzhledem k těmto důvodům je těžké usuzovat na významnost 10% kolokalizujících struktur proteinu VP1 s 20S proteazómy a bude zapotřebí zvolit jiné metody pro určení, zda je protein VP1 substrátem pro proteazómy (sledování ubiquitinylace VP1 pomocí metody imunoprecipitace).

## **5.5 Detekce buněčné a virové DNA v přítomnosti inhibitoru proteazómů MG-132**

Detekce virové DNA byla provedena pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace. Nejprve bylo zapotřebí připravit hybridizační sondu komplementární k částem virové DNA. Příprava této sondy proběhla bez problémů. Velikost sondy by se měla pohybovat v rozmezí 200 - 400 bp, aby došlo k úspěšné specifické hybridizaci sondy. Námi připravené sondy měly velikost okolo 300 bp a výsledky hybridizace potvrdily vhodnou velikost sondy, získaný signál byl silný a specifický vůči polyomavirové DNA.

DNA MPyV byla značena 16 a 24 hpi u buněk ošetřených a neošetřených proteazomálním inhibitorem MG-132 po celou dobu infekce. Ve vzorcích s MG-132 nebyla detekována žádná DNA 16 ani 24 hpi, kdežto u standardní infekce bez inhibitoru virová DNA pozorována byla. To může mít více důvodů. Jedno z vysvětlení může být takové, že proteazómy pozitivně ovlivňují časné fáze infekce, dopravu genomu do jádra, konkrétně například pomáhají rozvolnění virové kapsidy, které je nutné pro dopravení virové DNA do jádra hostitelské buňky. To ale neodpovídá našim předchozím zjištěním, kdy časově omezená inhibice proteazómů v časné fázi infekce vedla ke zvýšení počtu infikovaných buněk. Dalším vysvětlením může být fakt, že proteazomální inhibice negativně ovlivňuje virovou replikaci, a to buď přímo nebo negativní regulací buněčných či virových replikačních faktorů (kapitola 4.6, Luo *et al.* 2003, Satheshkumar *et al.* 2009). Abychom vysvětlili předchozí pozorování, provedli jsme další sérii pokusů, s různými časy přidávání a odmyvání MG-132 v průběhu infekce MPyV. Pokud jsme inhibitor proteazómů MG-132 přidali k infikovaným buňkám až 12 hpi (kdy ještě nelze detekovat virovou DNA) a nechali ho působit do fixace buněk 24 hpi, virová DNA byla detekována v podobné míře jako u kontroly (infikované buňky bez inhibitoru proteazómů). Naopak, pokud byl MG-132 přítomen na infikovaných myších fibroblastech prvních 12 hodin infekce, poté byl odmyt a buňky byly fixovány 24 hpi, detekovali jsme minimální množství virové DNA. Dále byl MG-132 k infikované buněčné kultuře přidáván až 2, 4, 6, 8 nebo 10 hpi a ponechán na kultuře do fixace buněk 24 hpi. Čím kratší dobu byl MG-132 na buňkách přítomen, tím větší procento buněk obsahujících virovou DNA bylo detekováno. Z uvedených výsledků spolu se zjištěními diskutovanými v kapitole 5.3 vyplývá, že v případě myších fibroblastů a MPyV má proteazomální inhibice pravděpodobně negativní vliv na replikaci virové DNA. A to je důvodem nedetekované virové DNA v přítomnosti proteazomálního inhibitoru spíše než vliv proteazómů na časná stadia infekce MPyV. Abychom zjistili, zda je inhibicí proteazómů ovlivněna pouze virová DNA, nebo jestli je zablokována i buněčná replikace, provedli jsme další pokusy, v nichž jsme sledovali množství celkové DNA v buněčné kultuře infikované MPyV s a bez MG-132. Měření jsme prováděli na průtokovém cytometru. Touto metodou nelze rozlišit virovou a buněčnou DNA. Protože jsme ale z předchozích výsledků věděli, že replikace virové DNA je za zvolených podmínek (MG-132 po celou dobu infekce) inhibována, počítali jsme s tím, že většina pozorované DNA bude buněčná. V případě infikovaných buněk bez MG-132 bylo naměřeno větší procento buněk obsahujících množství DNA  $> 2n$  oproti neinfikovaným buňkám.

Tento očekávaný jev je způsoben tím, že MPyV stimuluje vstup buňky do S-fáze buněčného cyklu, kdy jsou exprimovány buněčné proteiny nezbytné pro virovou replikaci (Dulbecco *et al.* 1965, Vogt *et al.* 1966). U infikovaných buněk bez MG-132 k celkovému množství DNA  $> 2n$  přispívá také nově replikovaná virová DNA. Jak u buněk infikovaných, tak u buněk neinfikovaných po ošetření inhibitorem MG-132 došlo ke snížení procenta buněk obsahujících množství DNA  $> 2n$  o 70 – 78% oproti buňkám neošetřeným MG-132. Tyto výsledky poměrně jasně ukazují na to, že proteazomální inhibitor MG-132 negativně ovlivňuje replikaci buněčné i virové DNA. Dále nás zajímalo, zda je množství DNA v buňce přímo závislé na délce působení inhibitoru proteazómů MG-132. Infikované buňky byly vystaveny působení MG-132 po dobu 12, 14, 16, 18, 20, 22 a 25 hodin, přičemž inhibitor byl přidán 2, 4, 6, 8, 10, 12 hpi a 1 hodinu před infekcí. Se zvyšující se dobou působení MG-132 docházelo ke snižování procenta buněk s množstvím DNA větším než  $2n$ . Zajímavý byl jev, kdy vzorky s MG-132 přítomným od 12 hpi do 24 hpi dosáhly velmi podobného procenta buněk s množstvím DNA větším než  $2n$  jako vzorky neošetřené MG-132. Zdá se tedy, že během druhých 12 hodin infekce MPyV není příliš ovlivněno množství virové a buněčné DNA - tedy že u buněk, které již prošly do S-fáze nehraje přítomnost proteazomálního inhibitoru MG-132 takovou roli. Toto zjištění koresponduje s výsledky zobrazenými na Obr. 4. 19. Negativní vliv proteazomálního inhibitoru MG-132 na množství buněčné a virové DNA v buňkách infikovaných MPyV tedy závisí na čase působení inhibitoru, ale také na fázi infekce, kdy k působení inhibitoru dochází. To může být způsobeno tím, že MG-132 inhibuje iniciaci replikace DNA a neovlivňuje již samotný průběh replikace. Tento jev pravděpodobně není důsledkem pomalé kinetiky působení inhibitoru, protože MG-132 je schopen dosáhnout 90% inhibice chymotrypsin-like aktivity, která má hlavní vliv na proteolýzu, po 20 - 30 minutách působení (Kisselev a Goldberg 2001, Rodgers a Dean 2003). Toto zjištění je pro studium vlivu proteazómů na průběh virové infekce poměrně zásadní. V literatuře (Jiang *et al.* 2009) je někdy negativní vliv proteazomálních inhibitorů na virovou infekci přičítán účasti proteazómů na rozvolnění virových kapsid. Působení proteazomálních inhibitorů je ale zřejmě mnohem komplexnější, než se předpokládalo a získané výsledky je tedy třeba hodnotit v tomto světle.

## 5.6 Příprava antigenu, unikátní části proteinu VP2 BK viru, na přípravu protilátky

Jedním z cílů této diplomové práce bylo připravit antigen – unikátní část proteinu VP2 BK viru za účelem přípravy protilátky. Nejprve bylo zapotřebí zkonstruovat expresní vektor s vloženou unikátní částí proteinu VP2 BKV. Vkládaný fragment byl připraven metodou PCR. Během PCR reakce došlo mimo vznik požadovaného fragmentu také ke vzniku nespecifických úseků DNA. Úspěch PCR reakce závisí na mnoha faktorech. Vznik nespecifických úseků DNA může být způsoben kontaminacemi vzorku cizorodou DNA nebo nespecifickou asociací primerů s templátovou DNA. Pro naposledy jmenovaný faktor ovlivňující úspěch PCR reakce je důležitá vhodná reasociační teplota použitých primerů. Problém vzniku nespecifických úseků DNA byl vyřešen izolací požadovaného PCR fragmentu z agarózového gelu.

V použitých primerech se vyskytovaly restrikční místa pro enzymy BamH I a Xho I, kterými byl naštěpen také použitý vektor. Po ligaci vektoru s fragmentem (DNA unikátní části proteinu VP2 BK viru) a následné transformaci bakterií tímto DNA konstruktem byly narostlé bakterie testovány na obsah požadovaného plazmidu. Z 12 testovaných monoklonií bakterií byla pozitivní jedna monoklonie, která obsahovala plazmid s vloženou DNA unikátní částí VP2 BKV. Tento relativně malý poměr počtu pozitivních monoklonií může být dán tím, že na počátku experimentu nebyly naštěpeny restrikčními enzymy všechny molekuly vektorové DNA, přestože na agarózové elektroforéze nedoštěpené úseky DNA nebyly pozorovány. Tyto nenaštěpené molekuly vektorové DNA byly součástí ligační směsi, která byla elektroporována do bakterií, ale do těchto molekul vektoru nemohl být vložen požadovaný fragment. Mezi vyrostlými monokloniemi po transformaci bakterií byly tedy také tyto molekuly, které DNA unikátní části VP2 BKV neobsahovaly. Toto úskalí by mohlo být minimalizováno izolací štěpené vektorové DNA z agarózového gelu.

Získaná plazmidová DNA z pozitivní monoklonie byla sekvenována, abychom zjistili, zda došlo ke správnému vložení fragmentu do vektoru a zda nedošlo k mutacím v požadovaném úseku. Bylo zjištěno, že v DNA unikátní části VP2 BKV z pozitivní monoklonie se vyskytují 3 mutace. Žádná z mutací nezpůsobila posun čtecího rámce a všechny mutace se vyskytují u N konce unikátní části proteinu VP2 BKV. První mutace byla v tripletu TTA, místo něho se objevil triplet TTG. V tomto případě se jedná o mutaci bez změny smyslu. Druhá mutace se vyskytla v kodonu AAG, místo tohoto tripletu vznikl mutovaný triplet AGG. Tato mutace vede k záměně lyzinu za aginin. Obě zmíněné aminokyseliny jsou bazické pozitivně nabitě.

Třetí mutace se objevila v kodonu GAT, kde se vyskytl mutovaný triplet AGT. Zde se do výsledného proteinu místo asparátové kyseliny zařazuje aminokyselina serin. V tomto případě se jedná o záměnu aminokyseliny se záporně nabitou skupinou za aminokyselinu s polární nenabitou skupinou. Vzhledem k tomu, že nebyla nalezena žádná jiná pozitivní bakteriální monokolonie obsahující plazmidovou DNA s unikátní částí VP2 BKV a také vzhledem k tomu, že vzniklé mutace by snad neměly do velké míry ovlivnit konformaci proteinu, jsme se rozhodli s tímto DNA konstruktem dále pracovat. Bylo by vhodné udělat modelaci mutovaného fragmentu, ale vzhledem k tomu, že bohužel není známa konformace unikátní části proteinu VP2 BK viru a tudíž bychom namodelovanou konformaci nemohli srovnat s divokým typem proteinu, neměla by modelace mutovaného fragmentu velkého smyslu. Nicméně argumentem pro použití i tohoto mutovaného fragmentu jako imunizačního antigenu je skutečnost, že získané hybridomy budou selektovány na reálný (wild type) protein.

Následně byla získaná unikátní část proteinu VP2 BKV produkována v bakteriích jako protein díky bakteriálně kódované T7 RNA polymeráze, jejíž exprese je pod kontrolou promotoru inducibilního pomocí IPTG. Unikátní část proteinu VP2 BKV je v plazmidu vložena za T7 promotor. Pro následnou izolaci proteinu bylo vhodné, že protein byl detekován kromě celobuněčných lyzátů také ve frakci rozpustných proteinů.

Nakonec bylo přistoupeno k izolaci nadprodukovaného proteinu, tedy unikátní části VP2 BK viru. Izolace byla provedena na principu afinitní chromatografie díky kotvě HisTag umístěné za proteinem, která má afinitu k nikelnatým iontům. Izolace probíhala ve sloupcovém uspořádání přes kolonu s nikelnatými ionty. V průběhu purifikace byly jímány různé kontrolní frakce. Ve sběru II, což je vzorek jímáný po protečení kolonou, bylo detekováno relativně velké množství vstupního materiálu. Toto může být způsobeno suboptimálním složením vzorku či použitých pufrů. Mohlo by napomoci snížení koncentrace imidazolu v použitých puffrech. Příčinou také může být fakt, že kotva HisTag je částečně zablokována, pak by bylo vhodné zkusit purifikaci proteinu za denaturujících podmínek.

Po purifikaci proteinu se ve směsi nevyskytoval pouze protein unikátní část VP2 BK viru, avšak tento protein byl ve směsi zastoupen majoritně. Toto může být způsobeno částečnou degradací proteinu s kotvou, ale vzhledem k tomu, že se ve směsi objevovaly také proteiny o vyšší molekulové hmotnosti než požadovaný protein a ve směsi byly přítomny inhibitory proteáz, jiné vysvětlení bude více pravděpodobné. Ve směsi se mohly vyskytovat kontaminující látky, které měly také vysokou afinitu k nikelnatým iontům. Tomuto můžeme opět předejít vhodnou koncentrací imidazolu v použitých puffrech.



Před elucí můžeme zkusit promýt kolonu vazebným pufrem s takovou koncentrací imidazolu, která odstraní kontaminanty, ale přitom žádaný protein zůstane navázán na nikelnaté ionty v koloně. Mohlo by také pomoci pro eluci použít gradient imidazolu. Kontaminanty mohou být asociovány s proteinem s kotvou. Pak je možné zkusit přidat ke vzorku silnější detergent či redukční činidlo (manuál od firmy GE Healthcare, HisTrap FF crude, Instructions 11-0012-38 AF). Nakonec byla změřena koncentrace získané směsi purifikovaného proteinu unikátní části VP2 BK viru, která činila 0,23 mg/ml. Vzhledem k tomu, že celkový objem směsi byl 4 ml, takto připravený antigen může být použit pro imunizaci zvířete za cílem přípravy protilátky.

## **6. Souhrn**

**Cíl 1: Prozkoumat roli proteazómů v časných fázích životního cyklu myšího polyomaviru a přispět k objasnění úlohy proteazómů v životním cyklu viru SV40.**

- ✓ Byl úspěšně vyizolován MPyV a virus SV40, přičemž test na chymotrypsinovou a trypsinovou aktivitu ve virových inokulech byl negativní.
- ✓ Bylo zjištěno, že proteazómy či jiné proteázy inhibovatelné MG-132 pravděpodobně částečně zabraňují virionům MPyV dosáhnout jádra hostitelské buňky a exprimovat tak protein LT a že tedy nejsou potřebné během dopravy virového genomu do jádra.
- ✓ Byla nalezena 10% kolokalizace proteinu VP1 MPyV a viru SV40 s proteazómy. Ale vzhledem k velkému množství proteazómů vyskytujících se v buňce je těžké vyvodit z tohoto zjištění relevantní závěry. Bude zapotřebí zvolit jiné metody pro určení, zda je protein VP1 substrátem pro proteazómy.
- ✓ Bylo zjištěno, že inhibice proteazómů pomocí proteazomálního inhibitoru MG-132 má negativní vliv na replikaci DNA.

**Cíl 2: Připravit antigen – unikátní část proteinu VP2 BK viru – pro přípravu protilátky.**

- ✓ Byl připraven expresní vektor obsahující gen pro unikátní část proteinu VP2 BK viru. Ve vloženém genu se vyskytly tři mutace ve srovnání s divokým typem (wild-type) proteinu, přičemž žádná z mutací nezpůsobila posun čtecího rámce a dvě mutace zapříčinily změnu aminokyselin.
- ✓ Úspěšně byla vyprodukována unikátní část proteinu VP2 BKV v bakteriích BL-21.
- ✓ Byla izolována unikátní část proteinu VP2 BKV pomocí kotvy HisTag. Je tedy připraven antigen pro imunizaci zvířete za účelem přípravy protilátky.

## **7. Seznam použité literatury**

- Ahn, K., Erlander, M., Leturcq, D., Peterson, P. A., Früh, K., Yang, Y. (1996):** In vivo characterization of the proteasome regulator PA28. *J Biol Chem.* 271(30):18237-42.
- Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M. A., Dalianis, T., Ramqvist, T., Andersson, B. (2007):** Identification of a third human polyomavirus. *J Virol.* 81(8):4130-6.
- Apcher, G. S., Heink, S., Zantopf, D., Kloetzel, P. M., Schmid, H.P., Mayer, R.J., Krüger, E. (2003):** Human immunodeficiency virus-1 Tat protein interacts with distinct proteasomal  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. *FEBS Lett.* 553(1-2):200-4.
- Aridor, M. (2007):** Visiting the ER: the endoplasmic reticulum as a target for therapeutics in traffic related diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 59(8):759-81.
- Ashok, A., Atwood, W. J. (2003):** Contrasting Roles of Endosomal pH and the Cytoskeleton in Infection of Human Glial Cells by JC Virus and Simian Virus 40. *J Virol.* 77(2):1347-56.
- Baker, A., Rohleder, K. J., Hanakahi, L. A., Ketner, G. (2007):** Adenovirus E4 34k and E1b 55k oncoproteins target host DNA ligase IV for proteasomal degradation. *J Virol.* 81(13):7034-40.
- Biederer, T., Volkwein, C., Sommer, T. (1996):** Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 15(9):2069-76.
- Biederer, T., Volkwein, C., Sommer, T. (1997):** Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science.* 278(5344):1806-9.
- Blickwedehl, J., Agarwal, M., Seong, C., Pandita, R. K., Melendy, T., Sung, P., Pandita, T. K., Bangia, N. (2008):** Role for proteasome activator PA200 and postglutamyl proteasome activity in genomic stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(42):16165-70.
- Blickwedehl, J., McEvoy, S., Wong, I., Kousis, P., Clements, J., Elliott, R., Cresswell, P., Liang, P., Bangia, N. (2007):** Proteasomes and proteasome activator 200 kDa (PA200) accumulate on chromatin in response to ionizing radiation. *Radiat Res.* 167(6):663-74.
- Bres, V., Kiernan, R. E., Linares, L. K., Chable-Bessia, C., Plechakova, O., Tréand, C., Emiliani, S., Peloponese, J. M., Jeang, K. T., Caux, O., Scheffner, M., Benkirane, M. (2003):** A non-proteolytic role for ubiquitin in Tat-mediated transactivation of the HIV-1 promoter. *Nat Cell Biol.* 5(8):754-61.
- Caruso, M., Belloni, L., Sthandier, O., Amati, P., Garcia, M. I. (2003):** Alpha4beta1 integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *J Virol.* 77(7):3913-21.
- Cavaldesi, M., Caruso, M., Sthandier, O., Amati, .P, Garcia, M. I. (2004):** Conformational changes of murine polyomavirus capsid proteins induced by sialic acid binding. *J Biol Chem.* 279(40):41573-9.

**Ciechanover, A. (1998):** The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17(24):7151-60.

**Ciechanover, A., Ben-Saadon, R. (2004):** N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol.* 14(3):103-6.

**Coscoy, L., Ganem, D. (2000):** Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(14):8051-6.

**Coscoy, L., Sanchez, D. J., Ganem, D. (2001):** A novel class of herpesvirus-encoded membrane-bound E3 ubiquitin ligases regulates endocytosis of proteins involved in immune recognition. *J Cell Biol.* 155(7):1265-73.

**Čáslavský, J. (2009):** Zavádění nového modelu primátích polyomavirů a studium jeho životního cyklu. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra genetiky a mikrobiologie.

**D'Andrea, A., Pellman, D. (1998):** Deubiquitinating enzymes: a new class of biological regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 33(5):337-52.

**Daniels, R., Rusan, N. M., Wadsworth, P., Hebert, D. N. (2006):** SV40 VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid protein VP1: implications for DNA translocation out of the ER. *Mol Cell.* 24(6):955-66.

**Delboy, M. G., Roller, D. G., Nicola, A. V. (2008):** Cellular proteasome activity facilitates herpes simplex virus entry at a postpenetration step. *J Virol.* 82(7):3381-90.

**Douar, A. M., Poulard, K., Stockholm, D., Danos, O. (2001):** Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol.* 75(4):1824-33.

**Drayman, N., Kler, S., Ben-nun-Shaul, O., Oppenheim, A. (2010):** Rapid method for SV40 titration. *J Virol Methods.* 164(1-2):145-7.

**Dulbecco, R., Hartwell, L. H., Vogt, M. (1965):** Induction of cellular DNA synthesis by polyoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 53:403-10.

**Eddy, B. E., Borman, G. S., Grubbs, G. E., Young, R. D. (1962):** Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell culture as simian virus 40. *Virology.* 17:65-75.

**Ellgaard, L., Frickel, E. M. (2003):** Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys.* 39(3):223-47.

**Engel, S., Heger, T., Mancini, R., Herzog, F., Kartenbeck, J., Hayer, A., Helenius, A. (2011):** Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection. *J Virol.* 85(9):4198-211.

**Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., Moore, P. S. (2008):** Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 319(5866):1096-100.

- Flint, S. J., Enquist L. W., Racaniello V. R., Skalka, A.M. (2004):** Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control of Animal Viruses. Second edition. ASM Press, Washington DC, USA.
- Furman, M. H., Ploegh, H. L. (2002):** Lessons from viral manipulation of protein disposal pathways. *J Clin Invest.* 110(7):875-9.
- Gardner, S. D., Field, A. M., Coleman, D. V., Hulme, B. (1971):** New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* 1(7712):1253-7.
- Garrus, J. E., von Schwedler, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Côté, M., Rich, R. L., Myszka, D. G., Sundquist, W. I. (2001):** Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell.* 107(1):55-65.
- Gaynor, A. M., Nissen, M. D., Whiley, D. M., Mackay, I. M., Lambert, S. B., Wu, G., Brennan, D. C., Storch, G. A., Sloots, T. P., Wang, D. (2007):** Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.* 3(5):e64.
- Gilbert, J., Benjamin, T. (2004):** Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J Virol.* 78(22):12259-67.
- Gilbert, J., Ou, W., Silver, J., Benjamin, T. (2006):** Downregulation of protein disulfide isomerase inhibits infection by the mouse polyomavirus. *J Virol.* 80(21):10868-70. Epub 2006 Aug 23.
- Gillece, P., Luz, J. M., Lennarz, W. J., de La Cruz, F. J., Römisch, K. (1999):** Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J Cell Biol.* 147(7):1443-56.
- Glickman, M. H., Ciechanover, A. (2002):** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82(2):373-428.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fried, V. A., Finley, D. (1998):** The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol.* 18(6):3149-62.
- Griffith, G. R., Consigli, R. A. (1984):** Isolation and characterization of monopinocytotic vesicles containing polyomavirus from the cytoplasm of infected mouse kidney cells. *J Virol.* 50(1):77-85.
- Groettrup, M., Pelzer, C., Schmidtke, G., Hofmann, K. (2008):** Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends Biochem Sci.* 33(5):230-7.
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H., Finley, D. (2000):** A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol.* 7(11):1062-7.
- Groll, M., Huber, R. (2004):** Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim Biophys Acta.* 1695(1-3):33-44.

- Gross, L. (1953):** A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 83(2):414-21.
- Haas, A. L., Warms, J. V., Hershko, A., Rose, I. A. (1982):** Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem.* 257(5):2543-8.
- Halawani, D., Latterich, M. (2006):** p97: The cell's molecular purgatory? *Mol Cell.* 22(6):713-7.
- Hammond, C., Helenius, A. (1995):** Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 7(4):523-9.
- Hampton, R. Y. (2002):** ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 14(4):476-82.
- Hanada, M., Sugawara, K., Kaneta, K., Toda, S., Nishiyama, Y., Tomita, K., Yamamoto, H., Konishi, M., Oki, T. (1992):** Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J Antibiot (Tokyo).* 45(11):1746-52.
- Hicke, L., Riezman, H. (1996):** Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell.* 84(2):277-87.
- Hiller, M. M., Finger, A., Schweiger, M., Wolf, D. H. (1996):** ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science.* 273(5282):1725-8.
- Hoppe, T. (2005):** Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci.* 30(4):183-7.
- Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihozi, T., Tremblay, L. O., Herscovics, A., Nagata, K. (2001):** A novel ER alpha mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep.* 2(5):415-22.
- Hurley, J. H., Lee, S., Prag, G. (2006):** Ubiquitin-binding domains. *Biochem J.* 399(3):361-72.
- Chen, L., Fluck, M. (2001):** Kinetic analysis of the steps of the polyomavirus lytic cycle. *J Virol.* 75(18):8368-79.
- Chen, X. S., Stehle, T., Harrison, S. C. (1998):** Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* 17(12):3233-40.
- Chu-Ping, M., Vu, J. H., Proske, R. J., Slaughter, C. A., DeMartino, G. N. (1994):** Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. *J Biol Chem.* 269(5):3539-47.
- Imperiale, M.J., Major, E.O. (2007):** Polyomaviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds.): *Fields Virology*. Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2263-98.



- Jakob, C. A., Burda, P., Roth, J., Aebi, M. (1998):** Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol.* 142(5):1223-33.
- Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D. H., Sommer, T. (2002):** Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol.* 4(2):134-9.
- Jiang, M., Abend, J. R., Tsai, B., Imperiale, M. J. (2009):** Early events during BK virus entry and disassembly. *J Virol.* 83(3):1350-1358
- Johnson, J. S., Samulski, R. J. (2009):** Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus. *J Virol.* 83(6):2632-44.
- Jung, T., Catalgol, B., Grune, T. (2009):** The proteasomal system. *Mol Aspects Med.* 30(4):191-296.
- Jung, T., Grune, T. (2008):** The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB Life.* 60(11):743-52.
- Kasper, J. S., Kuwabara, H., Arai, T., Ali, S. H., DeCaprio, J. A. (2005):** Simian virus 40 large T antigen's association with the CUL7 SCF complex contributes to cellular transformation. *J Virol.* 79(18):11685-92.
- Khor, B., Bredemeyer, A. L., Huang, C. Y., Turnbull, I. R., Evans, R., Maggi, L. B. Jr., White, J. M., Walker, L. M., Carnes, K., Hess, R. A., Sleckman, B. P. (2006):** Proteasome activator PA200 is required for normal spermatogenesis. *Mol Cell Biol.* 26(8):2999-3007.
- Khor, R., McElroy, L. J., Whittaker, G. R. (2003):** The ubiquitin-vacuolar protein sorting system is selectively required during entry of influenza virus into host cells. *Traffic.* 4(12):857-68.
- Kikkert, M., Hassink, G., Barel, M., Hirsch, C., van der Wal, F. J., Wiertz, E. (2001):** Ubiquitination is essential for human cytomegalovirus US11-mediated dislocation of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochem J.* 358(Pt 2):369-77.
- Kikonyogo, A., Bouamr, F., Vana, M. L., Xiang, Y., Aiyar, A., Carter, C., Leis, J. (2001):** Proteins related to the Nedd4 family of ubiquitin protein ligases interact with the L domain of Rous sarcoma virus and are required for gag budding from cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(20):11199-204.
- Kisselev, A. F., Goldberg, A. L. (2001):** Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.* 8(8):739-58.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., Jentsch, S. (1999):** A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell.* 96(5):635-44.

- Kostova, Z., Wolf, D. H. (2003):** For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J.* 22(10):2309-17.
- Lee, D. H., Goldberg, A. L. (1996):** Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 271(44):27280-4.
- Lee, D. H., Goldberg, A. L. (1998):** Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8(10):397-403.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., Masucci, M. G. (1997):** Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(23):12616-21.
- Liddington, R. C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T. L., Harrison, S. C. (1991):** Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature.* 354(6351):278-84.
- Liebl, D., Difato, F., Horníková, L., Mannová, P., Stokrová, J., Forstová, J. (2006):** Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection, and meets transferrin cargo in Rab11-positive endosomes. *J Virol.* 80(9):4610-22.
- Lilley, B. N., Gilbert, J. M., Ploegh, H. L., Benjamin, T. L. (2006):** Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection. *J Virol.* 80(17):8739-44.
- Liu, C. W., Corboy, M. J., DeMartino, G. N., Thomas, P. J. (2003):** Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science.* 299(5605):408-11.
- Luo, H., Zhang, J., Cheung, C., Suarez, A., McManus, B. M., Yang, D. (2003):** Proteasome inhibition reduces coxsackievirus B3 replication in murine cardiomyocytes. *Am J Pathol.* 163(2):381-5.
- Magnuson, B., Rainey, E. K., Benjamin, T., Baryshev, M., Mkrtchian, S., Tsai, B. (2005):** ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol Cell.* 20(2):289-300.
- Machiels, B. M., Henfling, M. E., Gerards, W. L., Broers, J. L., Bloemendal, H., Ramaekers, F. C., Schutte, B. (1997):** Detailed analysis of cell cycle kinetics upon proteasome inhibition. *Cytometry.* 28(3):243-52.
- Mannová, P., Forstová, J. (2003):** Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J Virol.* 77(3):1672-81.
- Mansouri, M., Bartee, E., Gouveia, K., Hovey Nerenberg, B. T., Barrett, J., Thomas, L., Thomas, G., McFadden, G., Früh, K. (2003):** The PHD/LAP-domain protein M153R of myxomavirus is a ubiquitin ligase that induces the rapid internalization and lysosomal destruction of CD4. *J Virol.* 77(2):1427-40.

- Meng, L., Mohan, R., Kwok, B. H., Elofsson, M., Sin, N., Crews, C. M. (1999):** Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(18):10403-8.
- Miranda, M., Sorkin, A. (2007):** Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol Interv.* 7(3):157-67.
- Molinari, M., Calanca, V., Galli, C., Lucca, P., Paganetti, P. (2003):** Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science.* 299(5611):1397-400.
- Mori, S., Heldin, C. H., Claesson-Welsh, L. (1993):** Ligand-induced ubiquitination of the platelet-derived growth factor beta-receptor plays a negative regulatory role in its mitogenic signaling. *J Biol Chem.* 268(1):577-83.
- Mukhopadhyay, D., Riezman, H. (2007):** Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science.* 315(5809):201-5.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Hayashi, S., Tanahashi, N., Tanaka, K. (2000):** Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun.* 267(1):1-6.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., Ichihara, A. (1992):** Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature.* 360(6404):597-9.
- Myung, J., Kim, K. B., Crews, C. M. (2001):** The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev.* 21(4):245-73.
- Nakatsukasa, K., Brodsky, J. L. (2008):** The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic.* 9(6):861-70.
- Nateri, A. S., Riera-Sans, L., Da Costa, C., Behrens, A. (2004):** The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling. *Science.* 303(5662):1374-8.
- Nishikawa, S. I., Fewell, S. W., Kato, Y., Brodsky, J. L., Endo, T. (2001):** Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol.* 153(5):1061-70.
- Norkin, L. C., Anderson, H. A., Wolfrom, S. A., Oppenheim, A. (2002):** Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J Virol.* 76(10):5156-66.
- Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I., Nagata, K. (2003):** EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science.* 299(5611):1394-7.
- Orlowski, M., Wilk, S. (2000):** Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys.* 383(1):1-16.

**Ortega, J., Heymann, J. B., Kajava, A. V., Ustrell, V., Rechsteiner, M., Steven, A. C. (2005):** The axial channel of the 20S proteasome opens upon binding of the PA200 activator. *J Mol Biol.* 346(5):1221-7. Epub 2005 Jan 26.

**Padgett, B. L., Walker, D. L., ZuRhein, G. M., Eckroade, R. J., Dessel, B. H. (1971):** Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet.* 1(7712):1257-60.

**Patnaik, A., Chau, V., Wills, J. W. (2000):** Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(24):13069-74.

**Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A. (2001):** Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol.* 3(5):473-83.

**Qian, M., Cai, D., Verhey, K. J., Tsai, B. (2009):** A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection. *PLoS Pathog.* 5(6):e1000465.

**Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., Kaelin, W. G., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Branton, P. E. (2001):** Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev.* 15(23):3104-17.

**Rainey-Barger, E. K., Magnuson, B., Tsai, B. (2007):** A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane. *J Virol.* 81(23):12996-3004.

**Rapoport, T. A. (2007):** Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature.* 450(7170):663-9.

**Ravid, T., Hochstrasser, M. (2008):** Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(9):679-90.

**Realini, C., Jensen, C. C., Zhang, Z., Johnston, S. C., Knowlton, J. R., Hill, C. P., Rechsteiner, M. (1997):** Characterization of recombinant REGalpha, REGbeta, and REGgamma proteasome activators. *J Biol Chem.* 272(41):25483-92.

**Rechsteiner, M., Realini, C., Ustrell, V. (2000):** The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J.* 345 Pt 1:1-15.

**Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Stokrová, J., Hozák, P., Korb, J., Forstová, J. (2001):** Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol.* 75(22):10880-91.

**Rodgers, K. J., Dean, R.T. (2003):** Assessment of proteasome activity in cell lysates and tissue homogenates using peptide substrates. *Int J Biochem Cell Biol.* 35(5):716-27.

**Ron, D., Walter, P. (2007):** Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(7):519-29.

**Ros, C., Burckhardt, C. J., Kempf, C. (2002):** Cytoplasmic trafficking of minute virus of mice: low-pH requirement, routing to late endosomes, and proteasome interaction. *J Virol.* 76(24):12634-45.

**Ros, C., Kempf, C. (2004):** The ubiquitin-proteasome machinery is essential for nuclear translocation of incoming minute virus of mice. *Virology.* 324(2):350-60.

**Roth, J., König, C., Wienzek, S., Weigel, S., Ristea, S., Dobbelstein, M. (1998):** Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton and E4 34-kilodalton oncoproteins. *J Virol.* 72(11):8510-6.

**Roth, J., Yam, G. H., Fan, J., Hirano, K., Gaplovska-Kysela, K., Le Fourn, V., Guhl, B., Santimaria, R., Torossi, T., Ziak, M., Zuber, C. (2008):** Protein quality control: the who's who, the where's and therapeutic escapes. *Histochem Cell Biol.* 129(2):163-77.

**Satheshkumar, P. S., Anton, L. C., Sanz, P., Moss, B. (2009):** Inhibition of the ubiquitin-proteasome system prevents vaccinia virus DNA replication and expression of intermediate and late genes. *J Virol.* 83(6):2469-79.

**Seeger, M., Ferrell, K., Frank, R., Dubiel, W. (1997):** HIV-1 tat inhibits the 20 S proteasome and its 11 S regulator-mediated activation. *J Biol Chem.* 272(13):8145-8.

**Shamu, C. E., Flierman, D., Ploegh, H. L., Rapoport, T. A., Chau, V. (2001):** Polyubiquitination is required for US11-dependent movement of MHC class I heavy chain from endoplasmic reticulum into cytosol. *Mol Biol Cell.* 12(8):2546-55.

**Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., Howley, P. M. (1993):** The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 75(3):495-505.

**Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., Howley, P.M. (1990):** The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 63(6):1129-36.

**Schelhaas, M., Malmström, J., Pelkmans, L., Haugstetter, J., Ellgaard, L., Grünewald, K., Helenius, A. (2007):** Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell.* 131(3):516-29.

**Schenková, K. (2006):** Studium dopravy genomu myšího polyomaviru do jádra buňky. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra genetiky a mikrobiologie.

**Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bannink, J. R., Krausslich, H. G., Yewdell, J. W. (2000):** Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(24):13057-62.

**Schwartz, O., Maréchal, V., Friguet, B., Arenzana-Seisdedos, F., Heard, J. M. (1998):** Antiviral activity of the proteasome on incoming human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 72(5):3845-50.

- Schwartz, R. A., Lakdawala, S. S., Eshleman, H. D., Russell, M. R., Carson, C. T., Weitzman, M. D. (2008):** Distinct requirements of adenovirus E1b55K protein for degradation of cellular substrates. *J Virol.* 82(18):9043-55.
- Soza, A., Knuehl, C., Groettrup, M., Henklein, P., Tanaka, K., Kloetzel, P. M. (1997):** Expression and subcellular localization of mouse 20S proteasome activator complex PA28. *FEBS Lett.* 413(1):27-34.
- Stadtmueller, B. M., Hill, C. P. (2011):** Proteasome activators. *Mol Cell.* 41(1):8-19.
- Staub, O., Rotin, D. (2006):** Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiol Rev.* 86(2):669-707.
- Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G., Gottlinger, H. G. (2000):** A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(24):13063-8.
- Stracker, T. H., Carson, C. T., Weitzman, M. D. (2002):** Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature.* 418(6895):348-52.
- Streuli, C.H., Griffin, B.E. (1987):** Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature.* 326(6113):619-22.
- Sun, F., Zhang, R., Gong, X., Geng, X., Drain, P. F., Frizzell, R. A. (2006):** Derlin-1 promotes the efficient degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and CFTR folding mutants. *J Biol Chem.* 281(48):36856-63.
- Tanaka, K. (2009):** The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85(1):12-36.
- Teale, A., Campbell, S., Van Buuren, N., Magee, W. C., Watmough, K., Couturier, B., Shipclark, R., Barry, M. (2009):** Orthopoxviruses require a functional ubiquitin-proteasome system for productive replication. *J Virol.* 83(5):2099-108.
- Tran, K., Mahr, J. A., Spector, D. H. (2010):** Proteasome subunits relocate during human cytomegalovirus infection, and proteasome activity is necessary for efficient viral gene transcription. *J Virol.* 84(6):3079-93.
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I., Rapoport, T. A. (2001):** Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell.* 104(6):937-48.
- Ustrell, V., Hoffman, L., Pratt, G., Rechsteiner, M. (2002):** PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J.* 21(13):3516-25.
- van der Meijden, E., Janssens, R. W., Lauber, C., Bouwes Bavinck, J. N., Gorbalenya, A. E., Feltkamp, M. C. (2010):** Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog.* 6(7):e1001024.

- Vashist, S., Ng, D. T. (2004):** Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol.* 165(1):41-52.
- Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W. (1999):** The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem.* 68:1015-68.
- Vogt, M., Dulbecco, R., Smith, B. (1966):** Induction of cellular DNA synthesis by polyoma virus. 3. Induction in productively infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 55(4):956-60.
- Wang, Q., Chang, A. (2003):** Substrate recognition in ER-associated degradation mediated by Eps1, a member of the protein disulfide isomerase family. *EMBO J.* 22(15):3792-802.
- Welcker, M., Clurman, B. E. (2005):** The SV40 large T antigen contains a decoy phosphodegron that mediates its interactions with Fbw7/hCdc4. *J Biol Chem.* 280(9):7654-8.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., Ploegh, H. L. (1996):** Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature.* 384(6608):432-8.
- Wójcik, C., Schroeter, D., Stoehr, M., Wilk, S., Paweletz, N. (1996):** An inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) induces arrest in G2-phase and metaphase in HeLa cells. *Eur J Cell Biol.* 70(2):172-8.
- Wójcik, C., Tanaka, K., Paweletz, N., Naab, U., Wilk, S. (1998):** Proteasome activator (PA28) subunits, alpha, beta and gamma (Ki antigen) in NT2 neuronal precursor cells and HeLa S3 cells. *Eur J Cell Biol.* 77(2):151-60.
- Wong, B. R., Parlati, F., Qu, K., Demo, S., Pray, T., Huang, J., Payan, D. G., Bennett, M. K. (2003):** Drug discovery in the ubiquitin regulatory pathway. *Drug Discov Today.* 8(16):746-54.
- Wu, G., Lyapina, S., Das, I., Li, J., Gurney, M., Pauley, A., Chui, I., Deshaies, R. J., Kitajewski, J. (2001):** SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Mol Cell Biol.* 21(21):7403-15.
- Xie, Y. (2010):** Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome. *J Mol Cell Biol.* 2(6):308-17.
- Yada, M., Hatakeyama, S., Kamura, T., Nishiyama, M., Tsunematsu, R., Imaki, H., Ishida, N., Okumura, F., Nakayama, K., Nakayama, K. I. (2004):** Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J.* 23(10):2116-25.
- Yan, Z., Zak, R., Luxton, G. W., Ritchie, T. C., Bantel-Schaal, U., Engelhardt, J. F. (2002):** Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors. *J Virol.* 76(5):2043-53.

**Ye, X., Nalepa, G., Welcker, M., Kessler, B. M., Spooner, E., Qin, J., Elledge, S. J., Clurman, B. E., Harper, J. W. (2004):** Recognition of phosphodegron motifs in human cyclin E by the SCF(Fbw7) ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 279(48):50110-9.

**Ye, Y., Meyer, H. H., Rapoport, T. A. (2001):** The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature.* 414(6864):652-6.

**Zhao, X., Madden-Fuentes, R. J., Lou, B. X., Pipas, J. M., Gerhardt, J., Rigell, C. J., Fanning, E. (2008):** Ataxia telangiectasia-mutated damage-signaling kinase- and proteasome-dependent destruction of Mre11-Rad50-Nbs1 subunits in Simian virus 40-infected primate cells. *J Virol.* 82(11):5316-28.

#### **Seznam použitých internetových zdrojů**

<http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=3BWQ> (15.7.2011)

[http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n5/fig\\_tab/nrc1361\\_F2.html](http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n5/fig_tab/nrc1361_F2.html) (17.7.2011)

<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest> (3.10.2010)